

10/500, 173
06/24/04

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003 年 7 月 17 日 (17.07.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/057888 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/64, C12P 21/00, C12Q
1/02, A61K 48/00, A61P 35/00, 43/00

菅原町 3-1-1 004 Osaka (JP). 山村 倫子 (YAMA-
MURA, Hisako) [JP/JP]; 〒630-0247 奈良県 生駒市 光
陽台 1 5 1 Nara (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP02/13683

(22) 国際出願日: 2002 年 12 月 26 日 (26.12.2002)

(74) 代理人: 廣田 雅紀 (HIROTA, Masanori); 〒107-0052
東京都 港区 赤坂二丁目 8 番 5 号若林ビル 3 階 Tokyo
(JP).

(25) 国際出願の言語: 日本語

(81) 指定国 (国内): CA, US.

(26) 国際公開の言語: 日本語

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY,
CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL,
PT, SE, SI, SK, TR).

(30) 優先権データ:
特願 2001-402102

2001 年 12 月 28 日 (28.12.2001) JP

特願 2002-255395 2002 年 8 月 30 日 (30.08.2002) JP

添付公開書類:
— 国際調査報告書

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 科学技術
振興事業団 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY
CORPORATION) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県 川口市
本町四丁目 1 番 8 号 Saitama (JP).

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 高橋 克仁 (TAKA-
HASHI, Katsuhito) [JP/JP]; 〒563-0055 大阪府 池田市

(54) Title: CELL-SPECIFIC EXPRESSION/REPLICATION VECTOR

(54) 発明の名称: 細胞特異的発現複製ベクター

(57) Abstract: It is intended to provide a therapeutic method comprising constructing a cell-specific expression/replication vector usable in treating malignant tumor, etc. which is capable of expressing and replicating a gene in specific cells such as a malignant tumor without injuring normal cells (in particular, a vector capable of regulating the expression/replication at a desired point after the expression/replication) and transferring the vector into specific cells such as a malignant tumor *in vivo* followed by the expression thereof. The transcription initiation regulating domain of a human calponin gene which is cell-specifically expressed is acquired and ligated to the upstream of a viral replication-associated gene such as ICP4. Then a DNA encoding a protein such as an angiogenesis regulator or an apoptosis-associated factor is ligated to the viral replication-associated gene as described above via IRES, while a thymidine kinase gene in an intact state is integrated into a viral DNA. Thus a cell-specific expression/replication vector not acting on adult normal cells is constructed. The thus constructed vector is transfected into malignant tumor cells so as to selectively disrupt the malignant tumor cells.

[続葉有]

WO 03/057888 A1



(57) 要約:

悪性腫瘍等の治療に用いるために、悪性腫瘍等の特定の細胞で特異的に遺伝子を発現しつつ複製し、かつ正常細胞には損傷を与えないような、細胞特異的発現複製ベクター、特にその発現複製後の所望の時期に発現複製を抑制することができるベクターを構築し、悪性腫瘍等の特定の生体細胞に導入し発現させて治療する方法などを提供するものである。細胞特異的に発現するヒトカルポニン遺伝子の転写開始制御領域を取得し、これを I C P 4 等のウイルスの複製関連遺伝子上流に連結し、前記ウイルスの複製関連遺伝子に I R E S を介して血管新生抑制因子やアポトーシス関連因子等のタンパク質をコードする D N A を連結し、チミジンキナーゼ遺伝子はインタクトな状態で残したものを、ウイルス D N A に組み込んで、成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを構築し、この構築したベクターを悪性腫瘍細胞に感染導入させ、悪性腫瘍細胞を選択的に破壊する。

明 細 書

細胞特異的発現複製ベクター

5 技術分野

本発明は、特定の細胞に特異的に遺伝子を発現させ自己複製する成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター、特にその発現複製後の所望の時期に発現複製を抑制することができる細胞特異的発現複製ベクター、更には前記ベクターを用いて、特定の生体細胞で遺伝子を発現する方法、あるいは特定の細胞を破壊する方法等に関し、詳しくは、

10 (1) 癌の遺伝子治療分野において、特定の癌細胞そのものあるいは腫瘍内新生血管の増殖平滑筋細胞を特異的に破壊するために、遺伝子の発現を細胞特異的に行い得る発現複製ベクターを作製し、正常細胞には傷害を与えることなく治療を可能とし、治療終了後、ベクター感染細胞を

15 完全に除去することができる安全性の高い細胞特異的発現複製ベクターの構築や、(2) 肺や肝臓などの線維症に対する遺伝子治療の分野において、増殖筋線維芽細胞を特異的に破壊するために、遺伝子の発現を細胞特異的に行い得る発現複製ベクターを作製し、正常細胞には傷害を与えることなく治療を可能とし、治療終了後、ベクター感染細胞を完全に除

20 去することができる安全性の高い細胞特異的発現複製ベクターの構築や、

(3) スtent留置後や臓器移植後の血管狭窄や動脈硬化症、糖尿病性網膜症などの遺伝子治療分野において、増殖血管平滑筋細胞を特異的に破壊するために、遺伝子の発現を細胞特異的に行い得る発現複製ベクターを作製し、正常細胞には傷害を与えることなく治療を可能とし、治療

25 終了後、ベクター感染細胞を完全に除去することができる安全性の高い細胞特異的発現複製ベクターの構築や、(4) 糸球体腎炎の遺伝子治療の

分野において、増殖メサンギウム細胞を特異的に破壊するために、遺伝子の発現を細胞特異的に行い得る発現複製ベクターを作製し、正常細胞には傷害を与えることなく治療を可能とし、治療終了後、ベクター感染細胞を完全に除去することができる安全性の高い細胞特異的発現複製ベクターの構築等に関する。

背景技術

正常細胞には影響を与えず、癌細胞のみを選択的に傷害することができる、副作用の少ない理想的な癌の治療法が近年求められている。その一つとして遺伝子治療法が挙げられるが、かかる治療法は癌細胞に導入する遺伝子の細胞選択性や発現プロモーターの活性、ウイルスベクターの感染導入法など、いろいろなレベルで癌細胞選択性を高めることが可能であり、将来の有望な治療法として注目されている。しかし、すべての癌細胞において治療遺伝子を導入できないという共通の問題がある。

一方、癌の免疫細胞療法も、正常組織にもわずかながら組織特異的分化抗原の発現が認められることから、正常細胞に対する副作用が問題となっている。また、突然変異に基づく癌抗原は、個々の癌にその変異が限られるという欠点をもっていることから、それを分子標的とした癌の免疫細胞療法として一般化するには適しているとはいえない。

最近、感染と複製によって次々と増殖細胞のみを選択的に傷害する複製可能型単純ヘルペスウイルス（HSV）ベクターを用いた悪性脳腫瘍の遺伝子治療臨床研究が米国と英国で行われている（Gene Ther. 7, 859-866, 2000、Gene Ther. 7, 867-874, 2000）。複製可能型HSVベクターは、ウイルス複製に必須な Ribonucleotide reductase（RR）又は Thymidine kinase（TK）を欠失したベクターであり、これらの酵素は正常細胞では増殖時にのみ発現するが、腫瘍細胞では構成的に発現して

いる。そのため、このH S Vベクターは、正常細胞であれ腫瘍細胞であれ増殖の盛んな細胞に感染すると、細胞由来のR RやT Kを利用して複製され細胞溶解活性を示す。一方、国内では動物実験で、前立腺癌や膵臓癌に対する複製可能型H S Vベクターの抗腫瘍効果が報告されている

5 (J. Surg. Oncol. 72, 136-141, 1999) が、これらも細胞選択性がなく、安全性が低い。従って、血液脳関門があり、循環血液中にベクターが拡散しない脳ではヒトの治療に用いることができたが、脳以外の臓器での治療には適さないという問題点があった。

上記のことから、H S Vベクターの傷害活性を標的細胞特異的にコントロールできれば、さらに有効で安全な治療法になると考えられている。

10 これまでに、米国の Martuza らによって、アルブミンプロモーターを用いた肝腫瘍選択的な複製可能型H S Vベクターが報告されている (J. Virol. 71, 5124-5132, 1997)。しかし、かかるベクターを用いると肝細胞癌ではアルブミン遺伝子の発現が低下し、また正常な再生肝細胞をも

15 傷害することなどからヒトでの臨床応用には適さないと考えられている。その他、米国特許第 5 7 2 8 3 7 9 号明細書(「腫瘍あるいは細胞特異的単純ヘルペスウイルスの複製」)では、中皮腫に対する応用の可能性を述べているが、平滑筋肉腫や骨肉腫、消化管ストローマ腫瘍 (G I S T) などのヒトの肉腫全般、腫瘍血管、増殖性血管病変、増殖性糸球体腎炎、

20 肺、肝臓等の線維症あるいは悪性腫瘍の間質で増殖する筋線維芽細胞に対する治療への応用可能性の記述はなされていない。

肉腫の病因と病態に関する遺伝子解析により、一部の腫瘍で p 5 3 と R b の変異や融合遺伝子の存在が報告されているが、まだ広く治療に応用できる段階に至ってはいない。ヌードマウスを用いた動物実験で、

25 Milas らは複製能を持たないアデノウイルスベクターを用いて平滑筋肉腫細胞に p 5 3 遺伝子を導入し、腫瘍の増殖遅延効果があることを報告

している (Cancer Gene Ther. 7, 422-429, 2000)。その他、オステオカルシン遺伝子のプロモーターを用いて、自殺遺伝子であるチミジンキナーゼを骨肉種に導入発現させる方法が報告されている (Cancer Gene Ther. 5, 274-280, 1998) が、これは複製能を欠失したウイルスベクターを用いたものであり、遺伝子導入の効率が悪く、骨肉腫以外の肉腫には適用できない。特に、Milas らの報告では、本発明者らによる報告 (Cancer Res. 61, 3969-3977, 2001) に記載されているのと同じ、ヒト平滑筋細胞株 SK-LMS-1 を用いた実験例を示しているが、上記報告において使用したウイルスベクターの粒子量の 100 ~ 1000 倍多くのウイルス粒子を使用し、効果は上記報告におけるものよりも劣っている。従って、Milas 5 10 15 20 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267 268 269 270 271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283 284 285 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298 299 300 301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316 317 318 319 320 321 322 323 324 325 326 327 328 329 330 331 332 333 334 335 336 337 338 339 340 341 342 343 344 345 346 347 348 349 350 351 352 353 354 355 356 357 358 359 360 361 362 363 364 365 366 367 368 369 370 371 372 373 374 375 376 377 378 379 380 381 382 383 384 385 386 387 388 389 390 391 392 393 394 395 396 397 398 399 400 401 402 403 404 405 406 407 408 409 410 411 412 413 414 415 416 417 418 419 420 421 422 423 424 425 426 427 428 429 430 431 432 433 434 435 436 437 438 439 440 441 442 443 444 445 446 447 448 449 450 451 452 453 454 455 456 457 458 459 460 461 462 463 464 465 466 467 468 469 470 471 472 473 474 475 476 477 478 479 480 481 482 483 484 485 486 487 488 489 490 491 492 493 494 495 496 497 498 499 500 501 502 503 504 505 506 507 508 509 510 511 512 513 514 515 516 517 518 519 520 521 522 523 524 525 526 527 528 529 530 531 532 533 534 535 536 537 538 539 540 541 542 543 544 545 546 547 548 549 550 551 552 553 554 555 556 557 558 559 560 561 562 563 564 565 566 567 568 569 570 571 572 573 574 575 576 577 578 579 580 581 582 583 584 585 586 587 588 589 590 591 592 593 594 595 596 597 598 599 600 601 602 603 604 605 606 607 608 609 610 611 612 613 614 615 616 617 618 619 620 621 622 623 624 625 626 627 628 629 630 631 632 633 634 635 636 637 638 639 640 641 642 643 644 645 646 647 648 649 650 651 652 653 654 655 656 657 658 659 660 661 662 663 664 665 666 667 668 669 670 671 672 673 674 675 676 677 678 679 680 681 682 683 684 685 686 687 688 689 690 691 692 693 694 695 696 697 698 699 700 701 702 703 704 705 706 707 708 709 710 711 712 713 714 715 716 717 718 719 720 721 722 723 724 725 726 727 728 729 730 731 732 733 734 735 736 737 738 739 740 741 742 743 744 745 746 747 748 749 750 751 752 753 754 755 756 757 758 759 760 761 762 763 764 765 766 767 768 769 770 771 772 773 774 775 776 777 778 779 780 781 782 783 784 785 786 787 788 789 790 791 792 793 794 795 796 797 798 799 800 801 802 803 804 805 806 807 808 809 810 811 812 813 814 815 816 817 818 819 820 821 822 823 824 825 826 827 828 829 830 831 832 833 834 835 836 837 838 839 840 841 842 843 844 845 846 847 848 849 850 851 852 853 854 855 856 857 858 859 860 861 862 863 864 865 866 867 868 869 870 871 872 873 874 875 876 877 878 879 880 881 882 883 884 885 886 887 888 889 890 891 892 893 894 895 896 897 898 899 900 901 902 903 904 905 906 907 908 909 910 911 912 913 914 915 916 917 918 919 920 921 922 923 924 925 926 927 928 929 930 931 932 933 934 935 936 937 938 939 940 941 942 943 944 945 946 947 948 949 950 951 952 953 954 955 956 957 958 959 960 961 962 963 964 965 966 967 968 969 970 971 972 973 974 975 976 977 978 979 980 981 982 983 984 985 986 987 988 989 990 991 992 993 994 995 996 997 998 999 1000 1001 1002 1003 1004 1005 1006 1007 1008 1009 1010 1011 1012 1013 1014 1015 1016 1017 1018 1019 1020 1021 1022 1023 1024 1025 1026 1027 1028 1029 1030 1031 1032 1033 1034 1035 1036 1037 1038 1039 1040 1041 1042 1043 1044 1045 1046 1047 1048 1049 1050 1051 1052 1053 1054 1055 1056 1057 1058 1059 1060 1061 1062 1063 1064 1065 1066 1067 1068 1069 1070 1071 1072 1073 1074 1075 1076 1077 1078 1079 1080 1081 1082 1083 1084 1085 1086 1087 1088 1089 1090 1091 1092 1093 1094 1095 1096 1097 1098 1099 1100 1101 1102 1103 1104 1105 1106 1107 1108 1109 1110 1111 1112 1113 1114 1115 1116 1117 1118 1119 1120 1121 1122 1123 1124 1125 1126 1127 1128 1129 1130 1131 1132 1133 1134 1135 1136 1137 1138 1139 1140 1141 1142 1143 1144 1145 1146 1147 1148 1149 1150 1151 1152 1153 1154 1155 1156 1157 1158 1159 1160 1161 1162 1163 1164 1165 1166 1167 1168 1169 1170 1171 1172 1173 1174 1175 1176 1177 1178 1179 1180 1181 1182 1183 1184 1185 1186 1187 1188 1189 1190 1191 1192 1193 1194 1195 1196 1197 1198 1199 1200 1201 1202 1203 1204 1205 1206 1207 1208 1209 1210 1211 1212 1213 1214 1215 1216 1217 1218 1219 1220 1221 1222 1223 1224 1225 1226 1227 1228 1229 1230 1231 1232 1233 1234 1235 1236 1237 1238 1239 1240 1241 1242 1243 1244 1245 1246 1247 1248 1249 1250 1251 1252 1253 1254 1255 1256 1257 1258 1259 1260 1261 1262 1263 1264 1265 1266 1267 1268 1269 1270 1271 1272 1273 1274 1275 1276 1277 1278 1279 1280 1281 1282 1283 1284 1285 1286 1287 1288 1289 1290 1291 1292 1293 1294 1295 1296 1297 1298 1299 1300 1301 1302 1303 1304 1305 1306 1307 1308 1309 1310 1311 1312 1313 1314 1315 1316 1317 1318 1319 1320 1321 1322 1323 1324 1325 1326 1327 1328 1329 1330 1331 1332 1333 1334 1335 1336 1337 1338 1339 1340 1341 1342 1343 1344 1345 1346 1347 1348 1349 1350 1351 1352 1353 1354 1355 1356 1357 1358 1359 1360 1361 1362 1363 1364 1365 1366 1367 1368 1369 1370 1371 1372 1373 1374 1375 1376 1377 1378 1379 1380 1381 1382 1383 1384 1385 1386 1387 1388 1389 1390 1391 1392 1393 1394 1395 1396 1397 1398 1399 1400 1401 1402 1403 1404 1405 1406 1407 1408 1409 1410 1411 1412 1413 1414 1415 1416 1417 1418 1419 1420 1421 1422 1423 1424 1425 1426 1427 1428 1429 1430 1431 1432 1433 1434 1435 1436 1437 1438 1439 1440 1441 1442 1443 1444 1445 1446 1447 1448 1449 1450 1451 1452 1453 1454 1455 1456 1457 1458 1459 1460 1461 1462 1463 1464 1465 1466 1467 1468 1469 1470 1471 1472 1473 1474 1475 1476 1477 1478 1479 1480 1481 1482 1483 1484 1485 1486 1487 1488 1489 1490 1491 1492 1493 1494 1495 1496 1497 1498 1499 1500 1501 1502 1503 1504 1505 1506 1507 1508 1509 1510 1511 1512 1513 1514 1515 1516 1517 1518 1519 1520 1521 1522 1523 1524 1525 1526 1527 1528 1529 1530 1531 1532 1533 1534 1535 1536 1537 1538 1539 1540 1541 1542 1543 1544 1545 1546 1547 1548 1549 1550 1551 1552 1553 1554 1555 1556 1557 1558 1559 1560 1561 1562 1563 1564 1565 1566 1567 1568 1569 1570 1571 1572 1573 1574 1575 1576 1577 1578 1579 1580 1581 1582 1583 1584 1585 1586 1587 1588 1589 1590 1591 1592 1593 1594 1595 1596 1597 1598 1599 1600 1601 1602 1603 1604 1605 1606 1607 1608 1609 1610 1611 1612 1613 1614 1615 1616 1617 1618 1619 1620 1621 1622 1623 1624 1625 1626 1627 1628 1629 1630 1631 1632 1633 1634 1635 1636 1637 1638 1639 1640 1641 1642 1643 1644 1645 1646 1647 1648 1649 1650 1651 1652 1653 1654 1655 1656 1657 1658 1659 1660 1661 1662 1663 1664 1665 1666 1667 1668 1669 1670 1671 1672 1673 1674 1675 1676 1677 1678 1679 1680 1681 1682 1683 1684 1685 1686 1687 1688 1689 1690 1691 1692 1693 1694 1695 1696 1697 1698 1699 1700 1701 1702 1703 1704 1705 1706 1707 1708 1709 1710 1711 1712 1713 1714 1715 1716 1717 1718 1719 1720 1721 1722 1723 1724 1725 1726 1727 1728 1729 1730 1731 1732 1733 1734 1735 1736 1737 1738 1739 1740 1741 1742 1743 1744 1745 1746 1747 1748 1749 1750 1751 1752 1753 1754 1755 1756 1757 1758 1759 1760 1761 1762 1763 1764 1765 1766 1767 1768 1769 1770 1771 1772 1773 1774 1775 1776 1777 1778 1779 1780 1781 1782 1783 1784 1785 1786 1787 1788 1789 1790 1791 1792 1793 1794 1795 1796 1797 1798 1799 1800 1801 1802 1803 1804 1805 1806 1807 1808 1809 1810 1811 1812 1813 1814 1815 1816 1817 1818 1819 1820 1821 1822 1823 1824 1825 1826 1827 1828 1829 1830 1831 1832 1833 1834 1835 1836 1837 1838 1839 1840 1841 1842 1843 1844 1845 1846 1847 1848 1849 1850 1851 1852 1853 1854 1855 1856 1857 1858 1859 1860 1861 1862 1863 1864 1865 1866 1867 1868 1869 1870 1871 1872 1873 1874 1875 1876 1877 1878 1879 1880 1881 1882 1883 1884 1885 1886 1887 1888 1889 1890 1891 1892 1893 1894 1895 1896 1897 1898 1899 1900 1901 1902 1903 1904 1905 1906 1907 1908 1909 1910 1911 1912 1913 1914 1915 1916 1917 1918 1919 1920 1921 1922 1923 1924 1925 1926 1927 1928 1929 1930 1931 1932 1933 1934 1935 1936 1937 1938 1939 1940 1941 1942 1943 1944 1945 1946 1947 1948 1949 1950 1951 1952 1953 1954 1955 1956 1957 1958 1959 1960 1961 1962 1963 1964 1965 1966 1967 1968 1969 1970 1971 1972 1973 1974 1975 1976 1977 1978 1979 1980 1981 1982 1983 1984 1985 1986 1987 1988 1989 1990 1991 1992 1993 1994 1995 1996 1997 1998 1999 2000 2001 2002 2003 2004 2005 2006 2007 2008 2009 2010 2011 2012 2013 2014 2015 2016 2017 2018 2019 2020 2021 2022 2023 2024 2025 2026 2027 2028 2029 2030 2031 2032 2033 2034 2035 2036 2037 2038 2039 2040 2041 2042 2043 2044 2045 2046 2047 2048 2049 2050 2051 2052 2053 2054 2055 2056 2057 2058 2059 2060 2061 2062 2063 2064 2065 2066 2067 2068 2069 2070 2071 2072 2073 2074 2075 2076 2077 2078 2079 2080 2081 2082 2083 2084 2085 2086 2087 2088 2089 2090 2091 2092 2093 2094 2095 2096 2097 2098 2099 2100 2101 2102 2103 2104 2105 2106 2107 2108 2109 2110 2111 2112 2113 2114 2115 2116 2117 2118 2119 2120 2121 2122 2123 2124 2125 2126 2127 2128 2129 2130 2131 2132 2133 2134 2135 2136 2137 2138 2139 2140 2141 2142 2143 2144 2145 2146 2147 2148 2149 2150 2151 2152 2153 2154 2155 2156 2157 2158 2159 2160 2161 2162 2163 2164 2165 2166 2167 2168 2169 2170 2171 2172 2173 2174 2175 2176 2177 2178 2179 2180 2181 2182 2183 2184 2185 2186 2187 2188 2189 2190 2191 2192 2193 2194 2195 2196 2197 2198 2199 2200 2201 2202 2203 2204 2205 2206 2207 2208 2209 2210 2211 2212 2213 2214 2215 2216 2217 2218 2219 2220 2221 2222 2223 2224 2225 2226 2227 2228 2229 2230 2231 2232 2233 2234 2235 2236 2237 2238 2239 2240 2241 2242 2243 2244 2245 2246 2247 2248 2249 2250 2251 2252 2253 2254 2255 2256 2257 2258 2259 2260 2261 2262 2263 2264 2265 2266 2267 2268 2269 2270 2271 2272 2273 2274 2275 2276 2277 2278 2279 2280 2281 2282 2283 2284 2285 2286 2287 2288 2289 2290 2291 2292 2293 2294 2295 2296 2297 2298 2299 2300 2301 2302 2303 2304 2305 2306 2307 2308 2309 2310 2311 2312 2313 2314 2315 2316 2317 2318 2319 2320 2321 2322 2323 2324 2325 2326 2327 2328 2329 2330 2331 2332 2333 2334 2335 2336 2337 2338 2339 2340 2341 2342 2343 2344 2345 2346 2347 2348 2349 2350 2351 2352 2353 2354 2355 2356 2357 2358 2359 2360 2361 2362 2363 2364 2365 2366 2367 2368 2369 2370 2371 2372 2373 2374 2375 2376 2377 2378 2379 2380 2381 2382 2383 2384 2385 2386 2387 2388 2389 2390 2391 2392 2393 2394 2395 2396 2397 2398 2399 2400 2401 2402 2403 2404 2405 2406 2407 2408 2409 2410 2411 2412 2413 2414 2415 2416 2417 2418 2419 2420 2421 2422 2423 2424 2425 2426 2427 2428 2429 2430 2431 2432 2433 2434 2435 2436 2437 2438 2439 2440 2441 2442 2443 2444 2445 2446 2447 2448 2449 2450 2451 2452 2453 2454 2455 2456 2457 2458 2459 2460 2461 2462 2463 2464 2465 2466 2467 2468 2469 2470 2471 2472 2473 2474 2475 2476 2477 2478 2479 2480 2481 2482 2483 2484 2485 2486 2487 2488 2489 2490 2491 2492 2493 2494 2495 2496 2497 2498 2499 2500 2501 2502 2503 2504 2505 2506 2507 2508 2509 2510 2511 2512 2513 2514 2515 2516 2517 2518 2519 2520 2521 2522 2523 2524 2525 2526 2527 2528 2529 2530 2531 2532 2533 2534 2535 2536 2537 2538 2539 2540 2541 2542 2543 2544 2545 2546 2547 2548 2549 2550 2551 2552 2553 2554 2555 2556 2557 2558 2559 2560 2561 2562 2563 2564 2565 2566 2567 2568 2569 2570 2571 2572 2573 2574 2575 2576 2577 2578 2579 2580 2581 2582 2583 2584 2585 2586 2587 2588 2589 2590 2591 2592 2593 2594 2595 2596 2597 2598 2599 2600 2601 2602 2603 2604 2605 2606 2607 2608 2609 2610 2611 2612 2613 2614 2615 2616 2617 2618 2619 2620 2621 2622 2623 2624 2625 2626 2627 2628 2629 2630 2631 2632 2633 2634 2635 2636 2637 2638 2639 2640

殖血管平滑筋細胞を標的にした細胞選択的治療剤は未だ知られていない。実際、平滑筋細胞の増殖と遊走を促進する血小板由来増殖因子受容体の拮抗剤が強力な腫瘍新生血管抑制作用をもつことが報告され (Cancer Res. 60, 4152-4160, 2000)、腫瘍血管新生を抑制するために血管平滑筋を攻撃することの重要性が推測されるが、この方法は細胞非選択的であり、副作用も予想される。

また、増殖性血管病変特に、ステント留置後や心臓移植後の血管狭窄に対しては、新生内膜の平滑筋増殖を抑制する種々の薬剤が試みられているが、いずれも狭窄の予防には成功していない。最近の遺伝子治療の試みとしては、複製能を欠くアデノウイルスベクターを用いて、カルボニンの相同遺伝子である $SM22\alpha$ のプロモーターの制御下に $LacZ$ 遺伝子をバルーン傷害後のラット頸動脈の平滑筋細胞に選択的に導入した Leiden らの報告がある (J. Clin. Invest. 100, 1006-1014, 1997)。しかし、この実験では $LacZ$ 遺伝子が導入されたのは、標的細胞である内膜の増殖平滑筋ではなく中膜の平滑筋で、導入効率も極めて低いものであった。また、Nabel らも複製能のないアデノウイルスベクターを用いて $SM22\alpha$ のプロモーターの制御下に $LacZ$ 遺伝子を CAT (chloramphenicol acetyltransferase) 遺伝子をブタの動脈に導入する実験を行ったが、内膜の平滑筋細胞の 2.2%、中膜平滑筋細胞の 0.56% に遺伝子発現が認められたにすぎなかった (Mol. Med. 6, 983-991, 2000)。一方、複製可能型 HSV ベクターを用いてバルーン傷害後のラット頸動脈に感染させた宮武らの報告 (Stroke 30, 2431-2439, 1999) では、ウイルスの複製は主に内膜の増殖平滑筋で観察され、複製可能型ウイルスベクターを用いることの有用性が推測されるが、このベクターは細胞非選択的であり、内皮細胞や外膜線維芽細胞の破壊などの副作用も予想される。その他にもデコイやアンチセンス DNA などのオリゴヌク

レオチドを血管に直接導入する方法も発表されているが、導入効率が低く、血管平滑筋増殖の十分な抑制効果は期待できない。

また、増殖性糸球体腎炎に対する最近の遺伝子治療の試みとしては、
T G F β 1 の阻害作用をもつデコリン (decorin) や T G F β 受容体と I
5 g G F c 領域のキメラ遺伝子、また NFkappa B のデコイをリポソーム
ベクターを用いて腎糸球体に導入する方法が報告されている (Nature
Med. 2, 418-423, 1996; Kidney Int. 55, 465-475, 1999; Gene Ther. 7,
1326-1332, 2000) が、この方法は細胞非選択的であり、副作用も予想さ
れる。また、腎糸球体に選択的に遺伝子を導入するために、複製能を欠
10 くアデノウイルスベクターをポリスチレンの微小球 (microsphere) に結
合させてラットの大動脈に投与する方法が発表されている (Kidney Int.
58, 1500-1510, 2000) が、増殖性糸球体腎炎の原因となるメサンギウム
細胞以外に血管内皮細胞にも導入遺伝子の発現が認められ、治療の標的
化は未だ不完全である。さらに、アデノウイルスは免疫原性が強く、そ
15 れ自体が糸球体腎炎の原因となる免疫反応を惹起する危険性も指摘され
ている (Kidney Int. 61, S85-S88, 1997)。

他方、本発明者らは、ヒト由来の肉腫の腫瘍細胞に平滑筋の分化マ
ーカーとされるカルポニン遺伝子が発現していることを見い出し、はじめ
て報告した (Int. J. Cancer 79, 245-250, 1998, Sarcoma 3, 107-113,
20 1999, Intern. J. Cancer 82, 678-686, 1999)。その後、骨・軟部肉腫
に加えて消化管ストローマ腫瘍 (G I S T) や唾液腺肉腫、繊維肉腫、
悪性神経鞘腫など 20 種類近い間葉系細胞由来のヒト悪性腫瘍で、カル
ポニン遺伝子が異常発現していることが国内外で相次いで報告されてい
る。上記カルポニン (h 1 又は basic) は、X線結晶構造と、インビト
25 ロ及びインビボの機能解析により、アクチン分子の C 末端に結合して、
アクチン・ミオシンの滑り運動を抑制することが明らかにされている

(Biochem. Biophys. Res. Commun. 279, 150-157, 2000, J. Physiol. 529, 811-824, 2000)。カルボニン遺伝子は、成体では、平滑筋細胞に選択的に発現し、血管の分化のマーカーと考えられている (Physiol. Rev. 75, 487-517, 1995)。

5 また、上記米国特許第 5 7 2 8 3 7 9 号明細書や本発明者らによる報告 (Cancer Res. 61, 3969-3977, 2001) においては、HSV のチミジンキナーゼ (Thymidine kinase) をコードする DNA を欠失している複製可能型ベクターについて記述されているが、チミジンキナーゼを欠失している HSV は、抗ヘルペスウイルス薬であるアシクロビル (aciclovir) や
10 ガンシクロビル (ganciclovir) に対する感受性がなく、これらベクターをヒトの治療に応用する場合には、予期せぬウイルス感染の拡大を防ぐという安全対策の面において問題がないとはいえなかった。

その他、神経細胞での複製に関与する gamma 3 4 . 5 遺伝子を 2 コピーとも欠失し、L a c Z 遺伝子が Ribonucleotide reductase (I C P 6)
15 - l o c u s に挿入されている複製可能型 H S V - 1 ベクター G 2 0 7 (Nature Med. 1, 938-943, 1995) や、CMV プロモーター／エンハンサーによって発現する autofluorescent protein と cytosine deaminase を I C P 6 - l o c u s に相同組換え法で挿入した複製可能型 H S V -
20 1 ベクター H S V 1 y C D (Cancer Res. 61, 5447-5452, 2001) は知られていたが、ともに Ribonucleotide reductase が欠失する結果、増殖細胞でのみ複製可能であるが、細胞選択性をもたない。また、肺や肝臓などの線維症における増殖筋線維芽細胞を標的にして、選択的に破壊する治療法の報告はない。また、悪性腫瘍の間質で増殖する筋線維芽細胞を標的にした治療法もこれまで報告がない。

25 本発明の課題は、悪性腫瘍等の治療に用いるために、悪性腫瘍等の特定の細胞で特異的に遺伝子を発現しつつ複製し、かつ正常細胞には損傷

を与えないような、細胞特異的発現複製ベクター、特にその発現複製後の所望の時期に発現複製を抑制することができる細胞特異的発現複製ベクターを構築すること、更には、該ベクターを悪性腫瘍等の特定の生体細胞に導入し発現させて治療する方法などを提供することにある。

- 5 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究し、特定の腫瘍細胞や平滑筋細胞に特異的に発現するヒトカルボニン遺伝子の該細胞内における転写開始制御領域を取得し、ウイルス複製関連遺伝子の複製開始に必要な転写因子をコードする遺伝子の上流に組み込んで、これをウイルスDNAの複製に必須の酵素であるTK遺伝子と置き換えることによって、悪性腫瘍細胞や腫瘍内新生血管の増殖平滑筋細胞等の特定の細胞
10 で該遺伝子を発現させ、ウイルス複製を誘導し得る成人正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを構築した。この構築した細胞特異的発現複製ベクターを悪性腫瘍組織に導入したところ、腫瘍細胞や腫瘍新生血管の増殖平滑筋を選択的に傷害することを報告している（Cancer
15 Res. 61, 3969-3977, 2001；特願2001-143999）。

- 上記本発明者らが報告したカルボニンプロモーターをもつ複製可能型HSV-1ベクター（Cancer Res. 61, 3969-3977, 2001；特願2001-143999）や、前記米国のMartuzaらによる、アルブミニンプロモーターを用いた肝腫瘍選択的な複製可能型HSV-1ベクター（J.
20 Virol. 71, 5124-5132, 1997；米国特許5728379）が、これまでに発表された細胞特異的に複製可能なHSV-1ベクターであるが、どちらもウイルス複製に必須の転写因子であるICP4をコードする遺伝子を2つとも欠失したHSV-1変異体ウイルスd120を親株とし、プロモーターの上流にLacZcDNAを、下流にICP4cDNAを
25 接続し、d120のチミジンキナーゼ（Thimidine kinase）遺伝子座（TK-locus）に相同組み換えしたものである。したがって、ベクタ

一精製の過程で指標となるLacZ遺伝子の発現はTK遺伝子のプロモーターの制御下にある。

かかるチミジンキナーゼをコードするDNAを欠失している複製可能型HSV-1ベクターは、抗ヘルペスウイルス薬であるアシクロビル (aciclovir) やガンシクロビル (ganciclovir) に対する感受性が欠如している。したがって、ベクターを単一クローンにまで精製する方法は、相同組み換え後のウイルス混合液をICP4cDNAを導入したVer
oE5細胞に感染させ、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル-β
-D-ガラクトピラノシド (X-gal) アガロースオーバーレイ法で
10 LacZ遺伝子の発現を示す青色の染色によって、複数、好ましくは少数のプラークを回収し、ガンシクロビル (ganciclovir) の存在下でVer
oE5細胞に再び感染させるというプラーク精製のサイクルを繰り返すことによって行われてきた。抗ヘルペスウイルス薬によってTK-1
ocusで組み換えが起こらなかったウイルスすなわちTK遺伝子をもつ
15 ウイルスを排除する方法は、当然のことながらTK遺伝子をもつ細胞特異的発現複製ベクターの精製には適用することができない。

また、X-galアガロースオーバーレイ法は、スクリーニングの初期段階では単一のプラークを回収することは不可能である。さらに、この方法ではアガロースをオーバーレイした時点で、細胞の分裂増殖が停
20 止するとともにウイルスの複製も停止する結果、それ以降はウイルス粒子の数が増加しない。この場合、リボヌクレオチド還元酵素 (Ribonucleotide reductase, RR) 遺伝子のプロモーターなどTK遺伝子のプロモーターより活性の強いプロモーターによって発現されるLacZ遺伝子をもつ複製可能型ベクターでは、ベクター自身の複製能が高くない場合、TK遺伝子のプロモーターによって発現されるLacZ
25 遺伝子をもつ複製可能型ベクターのものと同程度に青色に染色された細

胞 1 個あたりのウイルス数が少ない。そのため、次のスクリーニングに向けて複製能力のあるベクターを回収することが困難である。

さらに、細胞特異的発現複製ベクターとして、I C P 4 c D N A と I R E S (internal ribosomal entry site) の下流に挿入した任意の遺伝子 (5 蛍光を発する Green Fluorescent Protein を発現する c D N A を好適に例示することができる) を連結させると、上記任意の遺伝子を細胞特異的な転写開始制御領域の制御下に発現させ、この任意の遺伝子の発現と L a c Z 遺伝子の発現の両方を指標にしてスクリーニングすることが可能となり、目的の場所に相同組み換えが起こったウイルスベクター 10 をより確実にしかも迅速に単離することができるとの知見を得た。

また、相同組み換え後の最初のスクリーニングに、細胞特異的に発現する遺伝子のプロモーターすなわち転写開始制御領域が活性化され得る I C P 4 (−) 細胞又は該遺伝子を発現する I C P 4 (−) 細胞に、細胞特異的発現複製ベクターを含む相同組み換え後のウイルス混合液を感 15 染させ、前記ウイルスを複製・増殖させた後、ベクター内に組み込んだ遺伝子の発現を指標にして、限界希釈法によって単一クローンにまで精製する方法を用いることによって、細胞特異的プロモーターの制御下に I C P 4 を発現するという目的の組み換えが起こったベクターを選別濃縮することができることを見い出した。さらに、チミジンキナーゼを温 20 存した細胞特異的発現複製ベクターは、アシクロビル (aciclovir) やガンシクロビル (ganciclovir) によってその感染細胞とともにウイルスを死滅させることが可能であり、予期せぬウイルス感染の拡大を防ぐという安全対策の面で優れた特性を有しているとの知見を得た。一方、チミジンキナーゼを欠失することを特徴とする細胞特異的複製可能型 H S V 25 − 1 ベクターである米国特許 5 7 2 8 3 7 9 号の発明および先に出願した特願 2 0 0 1 − 1 4 3 9 9 9 号の発明の実施例は、ヒトの治療への応

用には適さないとも考えられる。そして、細胞特異的発現複製ベクターが、実際にヒト軟部肉腫の中で最も頻度の高い悪性線維性組織球種（Malignant Fibrous Histiocytoma；MFH）や、ヒト消化管肉腫の中で最も頻度の高い消化管ストローマ腫瘍（Gastrointestinal stromal tumor；GIST）や、婦人科領域で最も頻度の高い子宮筋腫に対して治療効果をもつことをインビトロの細胞培養系または動物実験系で確認した。本発明は上記の知見に基づいて完成するに至ったものである。

発明の開示

- 10 すなわち本発明は、細胞特異的に発現する遺伝子の転写開始制御領域を所定の遺伝子の upstream に組み込んだ成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターにおいて、前記細胞特異的発現複製ベクターに存在するチミジンキナーゼ（Thymidine kinase）遺伝子を利用して所望の時期にその複製を抑制しうることを特徴とする成体正常細胞に作用しない
- 15 細胞特異的発現複製ベクター（請求項 1）や、細胞特異的に発現する遺伝子の転写開始制御領域が、配列番号 1 に示される塩基配列を含む領域であることを特徴とする請求項 1 記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター（請求項 2）や、配列番号 1 に示される塩基配列を含む領域が、配列番号 2 に示される塩基配列からなるヒトカルボニ
- 20 ン遺伝子プロモーターを含む領域であることを特徴とする請求項 2 記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター（請求項 3）や、配列番号 2 に示される塩基配列を含む領域が、配列番号 3 に示される塩基配列を含む領域であることを特徴とする請求項 3 記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター（請求項 4）や、細胞特
- 25 異的に発現する遺伝子の転写開始制御領域が、配列番号 1、配列番号 2 又は配列番号 3 に示される塩基配列において、1 若しくは数個の塩基が

- 欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、かつ転写開始制御活性を有する塩基配列を含む領域であることを特徴とする請求項 1 記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター（請求項 5）や、転写開始制御領域の上流にエンハンサーが組み込まれていることを特徴とする請求項 1 ～ 5 のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター（請求項 6）や、エンハンサーが 4 F 2 エンハンサーであることを特徴する請求項 6 記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター（請求項 7）や、所定の遺伝子のさらに下流に、所定の遺伝子とは異なる目的タンパク質をコードする DNA が連結され、前記転写開始制御領域の制御下に目的タンパク質を発現することを特徴とする請求項 1 ～ 7 のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター（請求項 8）や、目的タンパク質をコードする DNA が、IRES (internal ribosomal entry site) を介して所定の遺伝子に連結されていることを特徴する請求項 8 記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター（請求項 9）や、目的タンパク質をコードする DNA が、アポトーシスの促進に関連する遺伝子であることを特徴とする請求項 1 ～ 9 のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター（請求項 10）や、目的タンパク質をコードする DNA が、血管新生抑制作用をもつタンパク質をコードする DNA であることを特徴とする請求項 1 ～ 9 のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター（請求項 11）や、目的タンパク質をコードする DNA が、癌転移抑制作用をもつタンパク質をコードする DNA であることを特徴とする請求項 1 ～ 9 のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター（請求項 12）や、目的タンパク質をコードする DNA が、癌抑制作用をもつタンパク質をコードする DNA であることを特徴とする請求項 1 ～ 9 のい

れか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター（請求項 1 3）や、所定の遺伝子が、ウイルス複製関連遺伝子であることを特徴する請求項 1 ～ 1 3 のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター（請求項 1 4）や、ウイルス複製関連遺伝子が、 I C P 4 又は E 1 A であることを特徴する請求項 1 4 記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター（請求項 1 5）や、発現複製ベクターが、ウイルスベクターであることを特徴とする請求項 1 ～ 1 5 のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター（請求項 1 6）や、ウイルスベクターが、単純ヘルペスウイルスベクター（H S V ベクター）又はアデノウイルスベクターであることを特徴とする請求項 1 6 記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター（請求項 1 7）や、腫瘍細胞特異的、腫瘍新生血管の増殖平滑筋特異的、増殖性血管病変における増殖平滑筋特異的、糸球体腎炎における増殖メサングウム細胞特異的、又は線維症における増殖筋線維芽細胞特異的な発現複製ベクターであることを特徴とする請求項 1 ～ 1 5 のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター（請求項 1 8）や、リボヌクレオチドリダクターゼ(Ribonucleotide reductase)をコードする D N A をコードする D N A を欠失していることを特徴とする請求項 1 ～ 1 8 のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター（請求項 1 9）に関する。

また本発明は、請求項 1 ～ 1 9 のいずれかに記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを、生体細胞組織に導入し、発現複製させることを特徴とする成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターの遺伝子、タンパク質又はペプチドの発現複製方法（請求項 2 0）や、請求項 1 ～ 1 9 のいずれかに記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを、生体細胞組織に導入し、発現複製

させ、その後の所望の時期に、細胞特異的発現複製ベクターの発現複製を抑制することを特徴とする成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターの遺伝子、タンパク質又はペプチドの発現複製・抑制方法（請求項 2 1）や、細胞特異的発現複製ベクターの発現複製の抑制が、

- 5 アシクロビル（aciclovir）、ガンシクロビル（ganciclovir）等の抗ウイルス薬を用いることによる抑制であることを特徴とする請求項 2 1 記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターの遺伝子、タンパク質又はペプチドの発現複製・抑制方法（請求項 2 2）や、請求項 1 ～ 1 9 のいずれかに記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを、生体細胞組織に導入し、発現複製させて前記細胞特異的発現複製ベクターによるチミジンキナーゼ活性を測定することを特徴とする成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターの生体内分布を検出する方法（請求項 2 3）や、チミジンキナーゼ活性の測定が、¹²⁴I でラベルしたウラシル誘導体 F I A U を用いる Positron
- 10 Emission Tomography による測定であることを特徴とする請求項 2 3 記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターの生体内分布を検出する方法（請求項 2 4）に関する。

- さらに本発明は、生体細胞組織が、腫瘍組織、動脈狭窄組織、腎炎組織又は線維症組織であることを特徴とする請求項 2 0 ～ 2 4 のいずれか
- 20 記載の方法（請求項 2 5）や、請求項 1 ～ 1 9 のいずれかに記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを含むことを特徴とする治療薬（請求項 2 6）や、悪性腫瘍、線維症、増殖性血管病変又は増殖性糸球体腎炎に対する治療薬であることを特徴とする請求項 2 6 記載の治療薬（請求項 2 7）や、悪性線維性組織球種、消化管ストローマ
- 25 腫瘍又は子宮筋腫に対する治療薬であることを特徴とする請求項 2 7 記載の治療薬（請求項 2 8）や、請求項 1 ～ 1 9 のいずれかに記載の成体正

- 常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを、肺、肝臓などの線維症組織または乳がん、胃がん、膵臓がんなどの悪性腫瘍組織に導入し、遺伝子、蛋白およびペプチドを発現させ、増殖筋線維芽細胞を選択的に破壊することを特徴とする線維症及び悪性腫瘍の治療方法（請求項 29）
- 5 や、悪性線維性組織球種、消化管ストローマ腫瘍又は子宮筋腫を対象とすることを特徴とする請求項 29 記載の線維症及び悪性腫瘍の治療方法（請求項 30）や、請求項 1～19 のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを、血管狭窄組織または動脈硬化組織、糖尿病性網膜症組織に導入し、遺伝子、タンパク質又はペプチド
- 10 を発現させ、増殖平滑筋細胞又は血管周細胞を選択的に破壊することを特徴とする増殖性血管病変の治療方法（請求項 31）や、請求項 1～19 のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを、腎炎組織に導入し、遺伝子、タンパク質又はペプチドを発現させ、増殖メサングウム細胞を選択的に破壊することを特徴とする増殖性
- 15 糸球体腎炎の治療方法（請求項 32）や、細胞特異的発現複製ベクターを、静脈又は動脈に投与することを特徴とする請求項 29～32 のいずれか記載の治療方法（請求項 33）や、所望の時期に、細胞特異的発現複製ベクターの発現複製を抑制することを特徴とする請求項 29～33 のいずれか記載の治療方法（請求項 34）や、細胞特異的に発現する遺
- 20 伝子の転写開始制御領域が活性化され得る細胞又は該遺伝子を発現する細胞に、請求項 1～19 のいずれか記載の細胞特異的発現複製ベクターを含む相同組み換え後のウイルス混合液を感染させ、ベクター内に組み込んだ遺伝子の発現を指標にして、限界希釈法によって単一クローンにまで精製することを特徴とする細胞特異的発現複製ベクターの製造方法
- 25 （請求項 35）や、細胞が、ICP4（-）細胞であることを特徴とする請求項 35 記載の細胞特異的発現複製ベクターの製造方法（請求項 3

6) に関する。

図面の簡単な説明

第1図は、d12・CALP Δ RR作成の手順とその構造を示す写真
5 である。左は、pKpX2 (ICP6のXhoI断片) とICP6のS
tuI-XhoI断片をDIG標識プローブにしたサザンブロットの結果
を示す。d120は相同組み換えを行った親株で、2つのICP4遺
伝子とともに欠失したKOS株由来の変異体である。hrR3は、野性
10 型であるKOS株のRibonucleotide reductase (ICP6) 遺伝子のB
amHIサイトにLacZ遺伝子が挿入され(pKX2 β G3)、結果と
してICP6を欠失している。

第2図は、インビトロでのカルボニン陽性悪性腫瘍細胞 (SK-LMS
S-1 平滑筋肉腫) に対するd12・CALP Δ RRの選択的細胞傷害
活性を示す写真である。左上は、RT-PCRでカルボニンmRNAの
15 発現をみたもので、OST骨肉腫細胞では、カルボニンはほとんど発現
していない。右はプラークのX-Gal染色である。

第3図は、インビトロでのカルボニン陽性悪性腫瘍細胞 (SK-LMS
S-1 平滑筋肉腫) におけるd12・CALP Δ RRの複製をLacZ遺伝
子の発現を示すX-Gal染色で示し、カルボニンプロモーターの制御
20 下に発現するEGFP蛋白を蛍光顕微鏡で観察した写真である。LacZと
EGFPが共に発現している細胞を多数観察することができる。

第4図は、インビトロでのカルボニン陽性悪性腫瘍細胞 (SK-LMS
S-1 平滑筋肉腫) およびICP4 cDNAを導入したVer o E5細
胞におけるd12・CALP Δ RRの複製と細胞傷害活性のガンシクロ
25 ビル (ganciclovir) 感受性を示す写真である。左はガンシクロビル
(ganciclovir) 高感受性のhrR3と比較したものであり、右は、チミジ

ンキナーゼを欠失する d 1 2・C A L P (特願 2 0 0 1-1 4 3 9 9 9) と比較したもので、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ のガンシクロビル(ganciclovir)存在下で細胞傷害活性をみたものである。d 1 2・C A L P はガンシクロビル(ganciclovir)に感受性がない。

5 第 5 図は、カルポニン m R N A の発現及びインビトロでの細胞崩壊分析及びベクター複製分析を示す写真である。a は、ヒト肉腫（悪性線維性組織球腫）におけるカルポニン (h 1) m R N A の発現を示す。b は、腫瘍に対して d 1 2・C A L P Δ R R ベクター 0. 0 1 M O I を感染させたときのプラークの X-G a l 染色である。

10 第 6 図は、インビトロでの細胞崩壊分析及びベクター複製分析を示す写真である。a は G I S T 細胞に対して 0. 0 1 M O I の、b は、G I S T 細胞に対して 0. 1 M O I の、c は、子宮筋腫培養細胞に対して 0. 0 1 M O I の、d は、子宮筋腫培養細胞に対して 0. 1 M O I の、d 1 2・C A L P Δ R R ベクターをそれぞれ感染させたときのプラークの X-G a l 染色である。

15 第 7 図は、インビボでの皮下腫瘍に対する抗腫瘍効果を示すグラフである。

第 8 図は、インビボでの肺転移腫瘍における d 1 2・C A L P Δ R R ベクターの 1 回静脈内投与における複製の分析及び抗腫瘍効果を示す写真である。

20 第 9 図は、インビボでの d 1 2・C A L P Δ R R ベクターの 3 回静脈内投与によるヒト肺転移腫瘍の治療効果を示す写真である。

発明を実施するための最良の形態

25 本発明の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターとしては、細胞特異的に発現する遺伝子の転写開始制御領域を所定の遺伝子

の上流に組み込んだ成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターにおいて、前記細胞特異的発現複製ベクターに存在するチミジンキナーゼ (Thymidine kinase) 遺伝子を利用して所望の時期にその複製を抑制しうるベクターであれば特に制限されるものではないが、腫瘍細胞

5 特異的、腫瘍新生血管の増殖平滑筋特異的、増殖性血管病変における増殖平滑筋特異的、糸球体腎炎における増殖メサンギウム細胞特異的、又は線維症における増殖筋線維芽細胞特異的な発現複製ベクターが好ましく、上記細胞特異的に発現する遺伝子の転写開始制御領域としては、細胞特異的に発現している遺伝子のプロモーター領域や該プロモーターの一部の領域を挙げることができ、より具体的には、カルボニン遺伝子のプロモーターの-260から-219までの配列番号1に示される塩基配列を含む領域、好ましくは配列番号2に示される塩基配列からなるヒトカルボニン遺伝子プロモーター、より好ましくは配列番号3に示される塩基配列からなるヒトカルボニン遺伝子プロモーターとその構造遺伝子

10 子の一部を含む領域を例示することができる。また、細胞特異的に発現する遺伝子の転写開始制御領域として、上記配列番号1、配列番号2又は配列番号3に示される塩基配列において、1若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、かつ転写開始制御活性を有する塩基配列、例えばマウス、ラット及びブタ由来のカルボニンプロモーターのそれに相同な領域を含む領域を例示することができる。

15 20

上記の他、細胞特異的に発現する遺伝子の転写開始制御領域として、増殖平滑筋細胞を攻撃の標的にする場合は、SM22 α 遺伝子のプロモーター領域 (ヒトSM22 α 遺伝子では-480から-26までの配列; GenBank accession# D84342-D84344、マウスやラットあるいはその

25 他の哺乳動物由来のSM22 α 遺伝子ではそれに相同な領域)、内皮細胞を標的にする場合は、Flk-1のプロモーター領域又はFlt-1遺伝

子など内皮細胞特異的遺伝子のプロモーター領域を用いることができる。これらの場合にも、一部構造遺伝子を含む領域を転写開始制御領域とすることもできる。

上記細胞特異的に発現する遺伝子の転写開始制御領域の上流に、転写を著しく活性化するエンハンサーを連結することが好ましく、かかるエンハンサーとしてはアデノウイルス初期遺伝子のエンハンサー、モロニー Maus 白血病ウイルス末端反復配列のエンハンサー、ヒストン H 2 A 遺伝子エンハンサー、免疫グロブリンエンハンサー、インスリン遺伝子エンハンサー、c - f o s 遺伝子エンハンサー、T 細胞抗原受容体遺伝子エンハンサー、筋型クレアチンキナーゼ遺伝子エンハンサー、ヒト 4 F 2 重鎖（ヘビーチェーン）転写エンハンサー等のエンハンサーであれば特に制限されないが、細胞特異的に発現する遺伝子の転写開始制御領域が、カルボニン遺伝子のプロモーターの - 2 6 0 から + 7 3 までの配列を含む領域の場合、アミノ酸トランスポーターの活性化因子であると考えられている膜貫通構造を一回しか持たない二型膜糖タンパク質である 4 F 2 ヘビーチェーン遺伝子のエンハンサーであるヒト 4 F 2 重鎖転写エンハンサー（配列番号 4）等の 4 F 2 エンハンサーが転写効率を著しく高めうる点で好ましい。

本発明の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターの作製に用いられる所定の遺伝子としては、ウイルスの複製の開始又は維持に必要な遺伝子であれば特に制限されるものではなく、例えば、アデノウイルスの E 1 A 遺伝子、I C P 6（Ribonucleotide reductase）遺伝子などのウイルス複製関連遺伝子を挙げることができ、中でもヘルペスウイルスの複製開始に必要な転写因子をコードする遺伝子（I C P 4）を好適に例示することができる。また、これら遺伝子は、転写開始制御領域の下流に位置する本来の構造遺伝子の一部又は全部と上記所定の遺

伝子がインフレームで結合したものでよく、例えば、カルボニン蛋白質のN末側の一部とICP4蛋白質との融合タンパク質をコードするDNAを具体的に挙げるができる。

5 本発明の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターとして、所定の遺伝子のさらに下流に、所定の遺伝子とは異なる目的タンパク質をコードするDNAが連結され、前記転写開始制御領域の制御下に目的タンパク質を発現することができる細胞特異的発現複製ベクター、
10 具体的には、上記目的タンパク質をコードするDNAが、IRES (internal ribosomal entry site; 米国特許第4937190号明細書) を介して所定の遺伝子に連結されている細胞特異的発現複製ベクターを好適に挙げるができる。このIRES部分にカルボニンのホモログであるSM22 α 遺伝子のプロモーターを連結することもできる。かかるヒトSM22 α プロモーター配列は本発明者らが最初にクローニングし、報告しており(J. Biochem. (Tokyo) 122, 157-167, 1997)、プロモーター活性に重要な部分(ヒトSM22 α プロモーター領域のBamHI-DraI断片445bp)の塩基配列を配列番号5としてしめす。
15 その他、IRESに代えて、CMVプロモーターやCAGプロモーターエンハンサーを用いると、カルボニンのプロモーターの制御から外れ、細胞非選択的に下流の目的タンパク質をコードする遺伝子を発現させる
20 ことができる。

上記目的タンパク質をコードするDNAとしては、アポトーシスの促進に関連する遺伝子や、血管新生抑制作用をもつタンパク質をコードするDNAや、癌転移抑制作用をもつタンパク質をコードするDNAや、癌抑制作用をもつタンパク質をコードするDNA等を挙げることができ、
25 これらは2以上連結してもよい。上記アポトーシスの促進に関連する遺伝子としては、Bcl-x_s、Bok/Mtd、Bcl-Gs/Bra、

Bcl-GL、Bcl-Rambo、Hrk/DP5、Bik/Nbk
/Bik、Bad、Bid、BimL, S, EL/BodL, M, S,
Noxa/APR、Puma等のアポトーシス促進遺伝子を、血管新生
抑制作用をもつタンパク質をコードするDNAとしては、アンジオスタ
5 チン、エンドスタチン、可溶性Flk-1、可溶性Flt-1、可溶性FLT4、
Tie1、Tie2などのドミナントネガティブ受容体タンパク質をコ
ードするDNAを、癌転移抑制作用をもつタンパク質をコードするDN
Aとしては、マトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）阻害剤、ウシ
ラクトフェリン（bLF）などのタンパク質をコードするDNAを、癌
10 抑制作用をもつタンパク質をコードするDNAとしては、p21、p1
6、p15等の細胞周期抑制物質や、p53、Rb、IRF-1、AP
C等の細胞増殖抑制物質をコードするDNAを、それぞれ具体的に例示
することができるがこれらに限定されるものではない。

上記目的タンパク質をコードするDNAとして、EGFPcDNAや、
15 ルシフェラーゼ（Luciferase）遺伝子等のマーカータンパク質をコード
する遺伝子を挙げることができ、これらマーカータンパク質を発現する
ことができる細胞特異的発現複製ベクターは、スクリーニングや各種実
験等においてきわめて有用である。

本発明の成体では正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター
20 の作製に用いられるウイルスベクターの骨格としては、骨・軟部肉腫、
平滑筋肉腫、消化管ストローマ腫瘍（GIST）、悪性中皮腫、悪性繊維
性組織球腫（MFH）、繊維肉腫、悪性髄膜腫、子宮筋腫、神経鞘腫等の
腫瘍細胞又は腫瘍新生血管の増殖平滑筋あるいは血管周細胞に感染又は
遺伝子を導入し発現することができるベクターが好ましく、かかるベク
25 ターとしては、染色体、エピソーム、リボソーム及びウイルスに由来す
る発現ベクターを例示することができるが、SV40のようなパポバウ

イルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルスベクター、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルス、レトロウイルス由来のベクター、単純ヘルペスウイルスベクター（HSVベクター）等のウイルスベクターが好ましく、中でも、HSVベクターとアデノウイルスベクター、特に条件付き複製可能型HSVベクター、又は条件付き複製可能型アデノウイルスベクターが、遺伝子発現の高効率性、増殖細胞特異的細胞傷害活性などの点で好ましい。上記条件付き複製可能型HSVベクターとして、例えば、リボヌクレオチドリダクターゼ（Ribonucleotide reductase）をコードするDNAが欠失しているベクターを用いることにより、本発明の成体正常細胞に作用せず、ベクターの複製と遺伝子の発現を制御できる細胞特異的発現複製ベクターを好適に作製することができる。

本発明の成体では正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターの発現複製方法としては、前記の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを、生体細胞組織、好ましくは骨・軟部肉腫、平滑筋肉腫、消化管ストローマ腫瘍、悪性中皮腫、悪性繊維性組織球腫、繊維肉腫、悪性髄膜腫、神経鞘腫等の腫瘍が生じている組織の他、ステント留置後や臓器移植後の血管狭窄組織若しくは動脈狭窄組織、腎炎組織又は線維症組織、又はこれら組織を含む器官に直接導入又は腫瘍を養う血管系から注入、又は血管内にステント等を用いて直接注入し発現複製させる方法、又は腫瘍新生血管の増殖平滑筋を攻撃の標的とする場合は、悪性固形腫瘍の種類がいかなるものであれ、直接導入又は腫瘍を養う血管系から注入し、発現複製させる方法であれば、特に制限されるものではない。また、本発明の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターの遺伝子、タンパク質又はペプチドの発現複製・抑制方法としては、前記の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを、

上記生体細胞組織に導入して発現複製させ、その後の所望の時期に、例えば、アシクロビル (aciclovir)、ガンシクロビル (ganciclovir) 等の抗ウイルス薬を用いて、細胞特異的発現複製ベクターの発現複製を抑制する方法であれば、特に制限されるものでない。そしてまた、本発明の

5 治療薬としては、前記本発明の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを有効成分として含むものであればどのようなものでもよく、かかる治療薬としては生体細胞組織、好ましくは上記悪性腫瘍、線維症、増殖性血管病変、増殖性糸球体腎炎等に対する治療薬を具体的に例示することができる。

- 10 本発明の線維症及び悪性腫瘍の治療方法としては、前記本発明の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを、肺、肝臓などの線維症組織又は乳がん、胃がん、膵臓がんなどの悪性腫瘍組織に導入し、遺伝子、タンパク質又はペプチドを発現させる方法であれば特に制限されず、なかでも、増殖筋線維芽細胞だけを選択的に破壊する方法や、腫
- 15 瘍新生血管の増殖平滑筋又は血管周細胞だけを選択的に破壊する方法が好ましい。悪性腫瘍が生じている組織に導入する方法としては、悪性腫瘍に上記細胞特異的発現複製ベクターを直接注入する方法又は動静脈投与等の腫瘍を灌流する血管系に注入する方法を好適に例示することができる。本発明の増殖性血管病変の治療方法としては、前記本発明の成体
- 20 正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを、血管狭窄組織又は動脈硬化組織、糖尿病性網膜症組織に導入し、遺伝子、タンパク質又はペプチドを発現させる方法であれば特に制限されず、なかでも、増殖平滑筋細胞又は血管周細胞だけを選択的に破壊する方法を好適に例示することができる。また、本発明の増殖性糸球体腎炎の治療方法としては、
- 25 前記本発明の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを、腎炎組織に導入し、遺伝子、タンパク質又はペプチドを発現させる方法

であれば特に制限されず、なかでも、増殖メサンギウム細胞だけを選択的に破壊する方法を好適に例示することができる。そして、本発明の上記治療方法においては、細胞特異的発現複製ベクターの発現複製を、治療終了後等の所望の時期に、抑制することを大きな特徴としている。

- 5 本発明の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターの生体内分布を検出する方法としては、前記本発明の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを、生体細胞組織に導入し、発現複製させて前記細胞特異的発現複製ベクターによるチミジンキナーゼ活性を検出・測定することを特徴とし、具体的には、 ^{124}I でラベルしたウラシル誘導体 F I A U を生体に投与し、Positron Emission Tomography により ^{124}I を検出・測定することにより、細胞特異的発現複製ベクターの生体内分布を検出することができる (Nature Med. 7, 859-863, 2001)。
- 10

- 本発明の細胞特異的発現複製ベクターの製造方法としては、細胞特異的に発現する遺伝子の転写開始制御領域が活性化され得る細胞又は該遺伝子を発現する細胞、好ましくは I C P 4 (−) 細胞に、前記本発明の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを含む相同組み換え後のウイルス混合液を感染させ、ベクター内に組み込んだ遺伝子の発現を指標にして、限界希釈法によって単一クローンにまで精製するスクリーニング方法であれば特に制限されるものではなく、かかるスクリーニングによる本発明の細胞特異的発現複製ベクターの製造方法の確立により、前記本発明の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターをはじめて得ることができる。
- 15
- 20

以下に、実施例を掲げてこの発明を更に具体的に説明するが、この発明の範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

25 実施例 A [方法と材料]

A-1 (細胞、培養方法、抗体、及びウイルス)

ヒト平滑筋肉腫細胞株SK-LMS-1 (HTB-88)、及びペロ細胞 (CCL-81) は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (American Type Culuture Collection) から購入した。ヒト骨肉腫細胞株OST (RCB0454) は、理研ジーンバンク (RIKEN GENE BANK) から購入した。ICP4 遺伝子を導入したペロ細胞、E5 細胞は、N. Deluca (University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh) から供与されたものを用いた。ヒト悪性線維性組織球種細胞株 (MFH-AI) は、神奈川県立がんセンターの矢野間博士より供与されたものを用いた。ヒト消化管ストローマ腫瘍 (GIST) 細胞とヒト子宮筋腫細胞は、カルボニン蛋白を発現していることを免疫組織化学によって確認した手術標本から腫瘍塊を無菌的に摘出し、コラゲナーゼ (1 mg / ml ; Sigma Cat. # C-9722) 溶液で処理し、初代培養細胞を分離し、ベクターの感染実験にはRPMI 1640 培地で3~4 世代継代培養したものを用いた。SK-LMS-1 は1 mMのピルビン酸ナトリウムを添加したイーグルMEMで培養した。OST、ペロ及びE5 細胞は、DMEMで培養した。MFH-AI はRPMI 1640 培地で培養した。全ての培地には、最終濃度で10%の熱不活性化ウシ胎仔血清 (Upstate Biotechnologies)、2 mMのL-グルタミン、100 unit / mLのペニシリン、及び100 μ g / mLのストレプトマイシンがそれぞれ含まれている。また、上記全ての細胞は、加湿された5%のCO₂ 条件下で37℃にて培養した。

上記MFH-AI 細胞を、6 週齢の雌の無胸腺症ヌードマウス (BALB / c Slc-nu / nu) (日本SLC社製) の体側部に皮下注射して、腫瘍を定着させた。2 ヶ月後に解剖し、肺に転移した腫瘍塊を無菌的に摘出し、コラゲナーゼ (1 mg / ml ; Sigma Cat. # C-9722) 溶液で処理し、細胞を分離した。この細胞 1×10^6 個を6 週齢雌の無胸

腺症ヌードマウスの尾静脈から注入した。1ヶ月後再び肺に転移した腫瘍塊から前回と同様の方法で個々の腫瘍細胞を分離した。この操作をさらにもう1回繰り返し、ヒト悪性線維性組織球種MFH-AI細胞の高肺転移性の細胞株MFH-AI-LM細胞を分離した。

- 5 HSV-1又はHSV-2のICP4タンパク質に対するモノクローナル抗体(clone No.1101)は、Goodwin Institute for Cancer Researchのものを用了。イムノプロット分析は、文献(Int. J. Cancer 79, 245-250, 1998)記載の方法と同様に行った。化学ルミネッセンス(EL; Amersham Pharmacia Biotech社製)は、製造者のプロトコルに従って結合抗体を視覚化した。また、それぞれICP4導入Vero E5細胞又はベロ細胞に低多重度で感染させることにより生成した、HSVのICP4欠損変異体d120(J. Virol. 56, 558-570, 1985)及びHSVのICP6(ribonucleotide reductase)欠損変異体hrR3は、N. Deluca又はS. Weller博士(University of Connecticut Health Center, Farmington)からそれぞれ供与されたものを用了。
- 10
- 15

A-2 (RNAの調製とRT-PCR分析)

- 全RNAはIsogene RNA extraction kit(Nippon Gene社製)を用いて培養した細胞又は組織からそれぞれ抽出し、文献(Int. J. Cancer 79, 245-250, 1998)記載の半定量的RT-PCR分析を行った。PCR増幅の条件としては、94℃で40秒間変性させ、60℃で30秒間アニーリングし、72℃で90秒間伸長反応させるというサイクルを30回繰り返した。ヒトカルボニンプライマーとしては、5'-gagtgtgcagacggaacttcagcc-3'[フォーワードプライマー1(FP1); nt# 10-33 GenBank D17408; 配列番号6]と5'-gtctgtgcccagcttggggtc-3'
- 20
- 25
- [リバースプライマー1(RP1); nt# 660-680; 配列番号7]を、コントロールとしてのGAPDH(glyceraldehyde 3-phosphate

dehydrogenase) のプライマーとしては、5'-cccatcaccatcttccagga-3' [フォワードプライマー 2 (F P 2) ; nt# 342-360 ; 配列番号 8] と 5'-ttgtcataccaggaaaatgagc-3' [リバースプライマー 2 (R P 2) ; nt# 1052-1070 ; 配列番号 9] を用いて、それぞれ 671 bp と 731 bp の DNA を増幅させた。

A-3 (ヒトカルボニンプロモーターの単離)

文献 (J. Biochem. 120, 18-21, 1996) 記載の方法に従い、ヒトゲノム λ E M B L 3 ファージライブラリーのスクリーニングを行って、ヒトカルボニン遺伝子の 5' 上流側を含むゲノムクローンを単離した。5' 側が欠失した断片である p-1159 Luc、p-385 Luc、p-343 Luc、p-310 Luc、p-299 Luc、p-288 Luc、p-260 Luc、p-239 Luc、p-219 Luc、p-201 Luc、p-176 Luc、p-153 Luc をゲノムクローンを鑄型にして P C R 法で増幅することにより作製した。番号は、以後 + 1 と表示される A T G 翻訳開始コドンの上流に位置する DNA 断片の 5' 末端を示している。欠失したこれらの断片は + 73 の位置に共通の 3' 末端を有している。DQS-2000L DNA sequencer (SHIMADZU 社製) を製造者のプロトコールに従って使用し、該クローン断片のヌクレオチド配列を決定し、その配列は文献 (J. Biochem. 120, 18-21, 1996) に記載の配列 (DDBJ/GenBank™/ EMBL database ; accession No. D85611) と同一であることを確認した。文献 (Cancer Res. 61, 3969-3977, 2001) に記載の方法によって、最小の発現調節領域 (- 260 ~ + 73) を同定した。

A-4 (トランスフェクション及びルシフェラーゼ分析)

トランスフェクションする 24 時間前に、あらかじめ培養した細胞を分割し、プレート上に播いた。製造者のプロトコールに従い 1 ウエル当た

り、 $1.2 \mu\text{g}$ のプロモータープラスミドと、 $0.3 \mu\text{g}$ の pCAGGS/ β -gal 関連プラスミドと、 $3.75 \mu\text{l}$ の FuGENETM 6 トランスフェクション試薬 (Roche 社製) とを 6 ウエルディッシュに注入し、細胞 (5×10^4) をトランスフェクションした。トランスフェクションの
5 24 時間後、 $100 \mu\text{l}$ / ウエルの細胞溶解緩衝液 (PicaGeneTM ルシフェラーゼ分析システム、Toyo Ink 社製) 中で細胞を回収した。 4°C で $12000 \text{g} \times 5$ 分間の遠心分離を行った後、上清 ($20 \mu\text{l}$ 又は $30 \mu\text{l}$) をルシフェラーゼアッセイ及び β -ガラクトシダーゼアッセイにそれぞれ使用した。ルシフェラーゼ活性は BLR-201 luminescence reader
10 (Aloka 社製) を用いて測定した。 β -ガラクトシダーゼアッセイは、文献 (J. Biochem. (Tokyo) 122, 157-167, 1997) 記載の方法に準じて β ガラクトシダーゼ酵素分析システム (Promega 社製) を用いて行った。再現性を確認するため、全実験は最低三回繰り返した。細胞抽出物の β -ガラクトシダーゼ活性を測定することによりトランスフェクション効率を決定し、その値に応じて、ルシフェラーゼ活性 (光ユニット) を補
15 正した。SV40 エンハンサー及び SV40 プロモーターを含む pSV2-Luc 遺伝子の発現を比較することにより、種々の細胞株のトランスフェクション効率を評価した。データは、pSV2-Luc の値に対してノーマライズした吸光度 \pm S. E. を % として表している。

20 A-5 (ウィルスの調製)

ICP4 のコード領域を含む pGH108 (J. Virol. 56, 558-570, 1985) 由来の 4.1 kb の平滑末端 SalI-MseI 断片 (Johns Hopkins School of Medicine の Hayward 博士より提供) を、pAMP1 プラスミドにクローニングした 333 bp ヒトカルポニンプロモーター
25 ($-260 \sim +73$) の下流の平滑末端 BamHI サイトに挿入し、及びかかるプラスミドの SmaI サイトにヒト 4F2 重鎖転写エンハンサ

一 (Mol. Cell Biol. 9, 2588-2597, 1989) (Harvard Medical School
の Leiden 氏より提供) の 444bp の Not I 断片をサブクローンした。
この pAMP1/CALP-ICP4 プラスミドの 3' 側にある Hind
dIII サイトを平滑化し、pIRES2-EGFP プラスミド (Clontech
5 社) を、BamHI と AflII とを用いて二重消化させることにより得
られた 1576-bp 断片をサブクローンした。この BamHI-Afl
II 断片は、IRES 配列 (米国特許第 4937190 号明細書) と E
GFP 配列 (米国特許第 5625048 号及び第 5804387 号明細
書) および SV40 由来ポリ A シグナルから構成されている。次に、p
10 AMP1/CALP-ICP4-IRES2-EGFP プラスミドを E
coRI と SphI とを用いて二重消化させることにより得られた 6.
7-kb 断片を平滑化し、pKX2βG3 組換えベクターの StuI 平
滑末端サイトにサブクローニングした (pKX2βG3/CALP-ICP
4-IRES2-EGFP)。pKX2βG3 組換えベクター
15 (Conneticut 大学の Weller 氏より提供) は、ICP6 コード配列の 2.
3-kb XhoI 断片 (pKpX2) とその BamHI サイトに挿入さ
れた 3.0-kb の大腸菌 (Escherichia coli) 由来の LacZ 配列及び
pUC19 のバックボーンからなる (J. Virol. 62, 196-205, 1988)。
続いて、上記プラスミド pKX2βG3/CALP-ICP4-IR
20 ES2-EGFP を XhoI サイト (pKX2βG3 の 5' 側 ICP6
配列の 5' 側にある XbaI サイトと 3' 側 ICP6 配列の 3' 側にあ
る HindIII サイトをともに XhoI サイトで置換したもの) で線状
化し、pUC19 配列を除去した pRRΔ-CALP-ICP4-IR
ES2-EGFP と d120 ウイルス DNA とを、製造者のプロトコル
25 に従って Lipofectamine™ (GIBCO/BRL 社製) を使用し、6 ウェル組織培
養プレート中の ICP4cDNA を導入した Vero E5 細胞 (2.5×10^5

／well) のサブコンフルエント単層培養にコトランスフェクションした。トランスフェクション3時間後に20%DMEM培養液1mlを添加し、96時間後まで、4-hydroxymethylbenzoic acid (HMB A) 0.5 mg/mlを含む前記培養液(10%FBS/DMEM)で培養した。

- 5 プラーク形成を確認した後、HMB Aを含まない10%FBS/DMEMで24時間培養した。500 μ l/ウエルのコールドウイルスバッファ(150 mMのNaClを含む20 mMのTris-HCl; pH 7.5)に細胞を懸濁し、凍結保存した。

- 超音波処理(30秒間を3回)を組み合わせた凍結処理と解凍処理を
10 三回行い、上記懸濁液を溶解した。懸濁液を段階的に希釈し、96ウエル組織培養プレートのサブコンフルエント単層培養SK-LMS-1細胞に感染させた。感染後96時間1ウエルあたり100 μ lの11.3 μ g/mlのヒトIgG(Jackson ImmunoResearch Lab.社製)を含む1%FBS/DMEMで培養した。プラーク形成を確認し得たウエルを蛍光
15 顕微鏡下でのGFPの発現を指標にしてスクリーニングした。GFP陽性のプラークを含むウエルのSK-LMS-1単層培養細胞を前記培養液100 μ lに懸濁し、そのうちの6 μ lを用いて、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -D-ガラクトピラノシド(X-gal)を基質にした β ガラクトシダーゼ酵素活性を、 β ガラクトシダーゼ酵素
20 分析システム(Promega社製)を用いて測定した。 β ガラクトシダーゼ酵素活性陽性のウエルのSK-LMS-1細胞懸濁液を5000回転で5分間遠心し、ペレットを100 μ l/ウエルのコールドウイルスバッファに懸濁した。96ウエル組織培養プレートを用いた同様の限界希釈感染・ β ガラクトシダーゼ酵素活性測定法をVer o E 5細胞を用い
25 てさらに2回繰り返し、組換えウィルスベクターd12-CALP- Δ RRを単一のプラークとして精製した。ウィルスDNAを精製した後、

制限酵素 X h o I で消化し、I C P 6 c D N A の X h o I 断片 (2 . 3 - k b) をプローブにしたサザンブロット分析によりリボヌクレオチド還元酵素遺伝子座 (I C P 6 o r R R - l o c u s) での組換えを確認し得た (図 1) 。

- 5 1 0 ~ 2 0 個の 1 5 0 c m ² / tissue culture flasks (IWAKI CLASS 社製) 中の E 5 細胞に感染させ、4 8 時間後に剥離した細胞を回収することにより、ウィルスを調製した。4 ℃ で 5 分間、4 0 0 × g で遠心分離を行って細胞を収集し、1 0 m l のコールドウィルスバッファー (1 5 0 m M の N a C l を含む 2 0 m M の T r i s - H C l ; p H 7 . 5)
- 10 に懸濁した。超音波処理 (3 0 秒間を 3 回) を組み合わせた凍結処理と解凍処理を三回行い、上記細胞を溶解した。4 ℃ で 5 分間、1 5 0 0 × g で遠心分離を行ったあと、その上清に対してさらに 4 ℃ で 4 5 分間、1 5 0 0 0 × g で遠心分離を行った。その結果得られたペレットをコールドウィルスバッファーに懸濁し、V e r o E 5 細胞におけるプラーク
- 15 アッセイにより精製した d 1 2 ・ C A L P ・ Δ R R ウィルスベクターの力価を決定した。

A - 6 (インビトロでの細胞崩壊分析及びウィルス複製分析)

- 1 % の熱不活性 F B S / P B S 中で、感染多重度 (M O I) が 0 . 1 ~ 0 . 0 0 1 p f u / c e l l で、6 ウエル組織培養プレート中の細胞
- 20 のサブコンフルエント単層培養に d 1 2 ・ C A L P ・ Δ R R ウィルスベクターを感染させた。かかる感染細胞を 3 7 ℃ で 1 時間インキュベートし、その後、1 % の F B S と 1 1 . 3 μ g / m l のヒト I g G (Jackson ImmunoResearch Lab. 社製) を含む前記培地で培養した。感染の 4 8 時間後、プラーク / ウエルの数を計測した。ウィルス複製分析のために、
- 25 2 ウエル組織培養プレート中の S K - L M S - 1 細胞又は O S T 細胞の単層培養 (2 × 1 0 ⁵ 細胞 / w e l l) に、1 % の F B S / P B S 中に

て、感染多重度 (MOI) が 0.1 となるように d12・CALP・ Δ RR ウィルスベクターを感染させた。接種したウィルスを 1 時間後に取り除き、上記細胞を前記培地でインキュベートした。所定の時間 (12 時間、24 時間、48 時間) に、100 μ l のウィルスバッファーを用いて感染細胞をウエルから剥がした。細胞懸濁液 (1 μ l) を 10^{-3} 、 10^{-4} 及び 10^{-5} に希釈し、その後 Vero E5 細胞におけるウィルスの力価を決定した。

また、1% の熱不活性 FBS / PBS 中で、感染多重度 (MOI) が 0.01 / cell で、6 ウエル組織培養プレート中の MFH-A1-LM 細胞 (ヒト悪性線維性組織球種 MFH-A1 細胞の高肺転移性細胞株) のサブコンフルエント単層培養に d12・CALP・ Δ RR ウィルスを感染させた。また、感染多重度 (MOI) が 0.1 / cell 又は 0.01 / cell で、6 ウエル組織培養プレート中のヒト GIST 細胞及びヒト子宮筋腫培養細胞のサブコンフルエント単層培養に d12・CALP・ Δ RR ウィルスをそれぞれ感染させた。かかる感染細胞を 37℃ で 1 時間インキュベートし、その後、1% の FBS と 11.3 μ g / ml のヒト IgG (Jackson ImmunoResearch Lab. 社製) を含む前記培地で培養した。感染の 72 時間後、X-Gal 染色しプラーク / ウエルの数を計測した。

A-7 (インビトロでのウィルス複製の抗ヘルペスウイルス剤ガンシクロビル (ganciclovir) に対する感受性分析)

1% の熱不活性 FBS / PBS 中で、感染多重度 (MOI) が 0.01 pfu / cell で、24 ウエル組織培養プレート (5×10^4 / well) または 6 ウエル組織培養プレート (2.5×10^5 / well) 中の SK-LMS-1 細胞のサブコンフルエント単層培養にウィルスを感染させた。かかる感染細胞を 37℃ で 1 時間インキュベートし、その

後、1%のFBSと11.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のヒトIgG (Jackson ImmunoResearch Lab.社製)、種々の濃度(0~1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)のガンシクロビル(ganciclovir) (和光純薬社製)を含む前記培地で培養した。感染の48時間後に1ウェルあたりのプラーク数を計測した。

- 5 ICP4発現のイムノプロット分析のため、SK-LMS-1細胞及びOST細胞に、感染多重度(MOI)が0.01となるようにd12. CALP又はウィルスバッファーのみをそれぞれ感染させ、22時間培養したのち回収した。同量のタンパク質を9%のSDS-PAGEゲル電気泳動にかけ、ニトロセルロース膜(Bio-Rad社製)に移した。5%
10 のスキムミルク(DIFCO Laboratories社製)を用いて、膜を室温で2時間ブロッキングし、その後、抗ICP4抗体(希釈率1:1000)を用いて、4℃で一晩インキュベートした。

A-8 (インビボでの処理及び組織学的分析)

- ヒト皮下移植腫瘍に対するd12. CALP Δ RRベクターの1回静
15 脈内投与による治療効果を検討するために、ヒト悪性線維性組織球種MFH-AI細胞 1×10^7 個を、6週齢の雌の無胸腺症ヌードマウス(BALB/c Slc-nu/nu) (日本SLC社製)の体側部に皮下注射して、腫瘍を定着させた。腫瘍は、ヌードマウスに移植後19日で直径6から7mm程度(50~70 mm^3)に成長した。 1×10^7 p f u
20 /マウスのd12. CALP Δ RRベクターを含む100 μl のウィルス懸濁液(n=6)、あるいは同量のウィルス緩衝液(n=6)を、30ゲージの針を用いてそれぞれ尾静脈内に1回注入した。注入後所定の時間に腫瘍を測定し、式[0.53×長さ×幅の2乗]を用いて腫瘍容積を計算した。

- 25 また、ヒト肺転移腫瘍に対するd12. CALP Δ RRベクターの静脈内投与による治療効果を検討するために、ヒト悪性線維性組織球種M

FH-AI細胞の高肺転移性の細胞株MFH-AI-LM細胞 1×10^6 個を6週齢の雌の無胸腺症ヌードマウス(BALB/c Slc-nu/nu)(日本SLC社製)の尾静脈から1回注射して肺転移腫瘍モデルを作製した。MFH-AI-LM細胞を静脈注射した14日後、組織学的研究のため、 1×10^7 pfu/マウスのd12. CALP Δ RRベクターを含む 100μ lのウィルス懸濁液を、30ゲージの針を用いて1回静脈内投与し、その13日後にマウスを絶命させた。肺転組織全体並びに脳、肝臓、腎臓、心臓、小腸、子宮及び卵巣を取り出し標本とした。これら標本を、2%のパラホルムアルデヒド、0.5%のグルタルアルデヒドを用いて、1mMのMgCl₂を含むPBSで、4℃で1晩固定した。続いて、X-Gal(1mg/ml)、5mMのK₃Fe(CN₆)、5mMのK₄Fe(CN₆)及び1mMのMgCl₂をPBS中に含む基質溶液に、該腫瘍を37℃で4時間浸し、その後、3%のDMSOを含むPBSで洗浄し、X-Gal染色を行った。また、上記肺転組織全体の標本をブアン溶液[15%(v/v)の飽和ピクリン酸溶液、1.65%(v/v)のホルマリン、及び1%(v/v)の酢酸/PBS]で固定し、パラフィンに包埋した。ポリ-L-リジンでコートしたマイクロスライドに、厚さ4 μ mの切片をのせ、キシレン中で処理し、段階的濃度のアルコール溶液で脱水した。その後、Hematoxylin-Eosin染色を行い、d12. CALP Δ RRによる腫瘍組織の破壊を倒立型顕微鏡(オリンパスBX-50)を用いて観察した。

次に、MFH-AI-LM細胞 1×10^6 個又は 5×10^5 個を6週齢の雌の無胸腺症ヌードマウス(BALB/c Slc-nu/nu)(日本SLC社製)の尾静脈から注射して肺転移腫瘍モデルを作製した。MFH-AI-LM細胞を静脈注射した17日目、27日目及び34日目に、 1×10^7 pfu/マウスのd12. CALP Δ RRベクターを含

む $50 \mu\text{l}$ のウィルス懸濁液を、 30 ゲージの針を用いて 3 回静脈内投与し、 13 日後にマウスを絶命させた。肺転組織全体を取り出し、 2% のパラホルムアルデヒド、 0.5% のグルタルアルデヒドを用いて、 1 mM の MgCl_2 を含む PBS で、 4°C で 1 晩固定し、ヒト肺転移腫瘍

5 に対する d12 、 $\text{CALP}\Delta\text{RR}$ ベクターの静脈内投与による治療効果を調べた。

A-9 (統計学的分析)

無対の Student's t-test を使って、統計的差異を確認した。差異は $p < 0.05$ で、統計的に有意であると考えられた。

10 実施例 B [結果]

B-1 (カルポニン陽性細胞における組換え HSV ベクターのインビトロでの選択的複製)

カルポニン陽性細胞及び増殖細胞中で選択的に複製する HSV ベクターを構築するため、 $4\text{F}2$ エンハンサー/ -260 カルポニンプロモーター/ $\text{ICP}4$ / $\text{IRES}-\text{EGFP}$ を含む DNA 断片を、 $\text{ICP}4-\text{HSV}$ 変異体 d120 (*J. Virol.* 56, 558-570, 1985) の $\text{RR}(\text{ICP}6)$ 遺伝子座 (U_L36) に相同組み換え法を用いて挿入し、 d12 、 $\text{CALP}\Delta\text{RR}$ ベクターを作製した。 d12 、 $\text{CALP}\Delta\text{RR}$ ベクターは、 $\text{ICP}6$ プロモーターの制御下に β -ガラクトシダーゼを発現し、カル

15 ポニンプロモーターの制御下に $\text{ICP}4$ タンパク質と EGFP たんぱく質を発現させることが可能である (図 1)。カルポニン発現ヒト平滑筋肉腫細胞株 (SK-LMS-1) とカルポニン非発現ヒト骨肉腫細胞株 (OST) を使用して、 d12 、 $\text{CALP}\Delta\text{RR}$ ベクターのウィルス複製の細胞選択性を評価した。

25 ウィルス力価を感染多重度 0.1 ($2 \times 10^5 \text{ cells/well}$) のシングルステップグロースアッセイで評価した。 d12 、 $\text{CALP}\Delta$

RRベクターは、カルボニン陽性SK-LMS-1細胞中で複製したが、
d12. CALPΔRRの力価は感染の72時間後のカルボニン陰性O
ST細胞中ではSK-LMS-1細胞に比べて $1/10^5$ 程度に減少し
た(図2)。両細胞の増殖速度は同程度であった。感染22時間後の細胞
5 抽出物のイムノブロット分析を行った結果、SK-LMS-1細胞では
ICP4タンパク質が発現しているが、OST細胞ではICP4タンパ
ク質が発現していないことがわかった。これはウィルス複製分析結果と
一致していた。これに対し、相同組み換えの親株であるd120ウィル
スベクターは、SK-LMS-1及びOSTの培養物において子孫ウィ
10 ルスの産生はまったく見られなかった。

6ウェルディッシュ中のSK-LMS-1細胞にd12. CALPΔ
RRベクターを感染させ、感染の96時間後に、X-galアガロース
オーバーレイでβ-ガラクトシダーゼ発現細胞を青色に染色し、同時に
倒立型蛍光顕微鏡で、EGFPの発現を検証した。崩壊し死滅しつつあ
15 る腫瘍細胞にβ-ガラクトシダーゼが発現し、その周囲の生細胞にEG
FPが発現していることが確認できた(図3)。

1個の細胞に、両者の発現が同時に存在する例も多数観察された。

B-2(組換えHSV-1ベクターの抗ヘルペスウイルス剤ガンシクロ
ビル(ganciclovir)に対する感受性)

20 d12. CALPΔRRベクターをヒト悪性腫瘍の治療に応用する場
合、最も重要な特性は、TK遺伝子をインタクトな状態でもつため、抗
ヘルペスウイルス剤であるガンシクロビル(ganciclovir)に感受性を示
すことである。24ウェル(5×10^4 /well)ディッシュ中のS
K-LMS-1細胞に、種々の濃度(0~100ng/ml)のガンシ
25 クロビル(ganciclovir)存在下で、d12. CALPΔRRを多重感染度
0.01で感染させ、感染の48時間後に、X-galを基質にして染

色し、1ウェルあたりの β -ガラクトシダーゼ陽性のプラーク数を計測した。また、6ウェルディッシュ中のVeroE5細胞(2.5×10^5 /well)に $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ のガンシクロビル(ganciclovir)存在下と非存在下で、d12. CALP Δ RRベクターを感染させ、感染の48時間後に、X-galを基質にして染色した(図4)。

SK-LMS-1細胞、ICP4cDNAを導入したVeroE5細胞共に、ガンシクロビル(ganciclovir)の存在下でd12. CALP Δ RRベクターの複製が抑制された。SK-LMS-1細胞では、 $40 \text{ ng}/\text{ml}$ のガンシクロビル(ganciclovir)存在下で完全に抑制された。d12. CALP Δ RRベクターは、野性型ウイルスよりも同薬剤に感受性が高いことが報告されている(Cancer Res. 54, 3963-3966, 2001)複製可能型HSV-1変異体hrR3と同等のガンシクロビル(ganciclovir)に対する感受性を示した。この結果は、d12. CALP Δ RRベクターが治療後にガンシクロビル(ganciclovir)またはアシクロビル(aciclovir)でウイルス感染細胞を除去できる安全策を備えていることを示している。

B-3 (インビボでの処理及び組織学的分析)

MFH-AI-LM細胞株がカルボニンのmRNAを発現しているかどうかを、MFH-AI-LM細胞株の全RNAを対象とするRT-PCR分析により調べたところ、MFH-AI-LM細胞株がカルボニンのmRNAを発現していることが確認された(図5a)。また、上記MFH-AI-LM細胞株に、感染多重度0.01のd12. CALP Δ RRベクターを72時間感染させた。ベクターの複製は、X-Gal染色しプラーク形成を指標として評価した(図5b)。その結果、d12. CALP Δ RRベクターはMFH-AI-LM細胞内で複製され、MFH-AI-LM細胞に対して細胞溶解活性を示すことが確認された。さらに、GIST細胞及び子宮筋腫培養細胞に、感染多重度0.01又は0.

1 の d 1 2 . C A L P Δ R R

ベクターをそれぞれ 7 2 時間感染させた。
ベクターの複製は、X-Gal 染色しプラーク形成を指標として評価した (図 6)。その結果、d 1 2 . C A L P Δ R R

ベクターは G I S T 細胞 (6 図 a , b) 及び子宮筋腫培養細胞 (6 図 c , d) 内で複製され、0 .

5 0 1 M O I (6 図 a , c) 及び 0 . 1 M O I (6 図 b , d) の結果から
投与量に依存して細胞溶解活性を示すことが確認され、特に、0 . 1 M O I (6 図 b , d) の投与では視野中のすべての腫瘍細胞への d 1 2 . C A L P Δ R R

ベクターの感染が認められた。

M F H - A I 細胞により定着した皮下腫瘍に対する d 1 2 . C A L P Δ R R

10 Δ R R

ベクターのインビボでの抗腫瘍効果を調べた。M F H - A I - L M 細胞株の皮下移植腫瘍に対する d 1 2 . C A L P Δ R R

ベクターの 1 回静脈内投与による治療効果を経時変化として表した (図 7)。0 日に 1×10^7 p f u / マウスの d 1 2 . C A L P Δ R R

を尾静脈から注入した。静脈注射後 2 9 日目の治療 (d 1 2 . C A L P Δ R R 投与) 群と未

15 治療 (P B S 投与) 群の腫瘍体積 (mean \pm S . E . , n = 6) は、それぞれ 500 ± 136 mm³ と 183 ± 33 mm³ であった。治療群は未治療群に比べて有意な抗腫瘍効果を示した。

ヒト肺転移腫瘍に対する d 1 2 . C A L P Δ R R の静脈内投与によるインビボでの治療効果を調べた (図 8)。ヒト悪性線維性組織球種 M F H - A I 細胞の高肺転移性株 M F H - A I - L M 細胞を用いた肺転移腫瘍

20 モデルマウスの尾静脈から、 1×10^7 p f u / マウスの d 1 2 . C A L P Δ R R

ベクターを注入後 1 3 日目の肺転移腫瘍 (図 8 a , b) 及び正常組織である脳 (図 8 c)、心臓 (図 8 d)、肝臓 (図 8 e) の X - G a l 染色、並びに、Hematoxylin-Eosin 染色による肺転移腫瘍の組織学的解析 (図 8 f , g) を行った。d 1 2 . C A L P Δ R R の 1 回静脈内投与によって、肺転移巣に d 1 2 . C A L P Δ R R

25 ベクターの複製を示

すX-Gal染色と組織学的に腫瘍の壊死が認められたが、脳、心臓、肝臓などの正常組織ではベクターの感染と複製を示すX-Gal染色は認められなかった。

次に、MFH-AI-LM細胞の投与細胞数を 1×10^6 個又は 5×10^5 個とし、MFH-AI-LM細胞の投与後17日目、27日目及び34日目に 1×10^7 pfu/マウスのd12. CALP Δ RRベクターを計3回静脈内投与した場合のヒト肺転移腫瘍の治療効果を調べた(図9)。MFH-AI-LM腫瘍細胞 1×10^6 個又は 5×10^5 個を尾静脈から注射して作製した肺転移腫瘍モデルのいずれに対しても、d12. CALP Δ RRベクター投与の治療群の肺転移腫瘍抑制効果は明らかであった。また、Hematoxylin-Eosin染色による組織学的解析によっても治療群での転移抑制効果が確認された。

産業上の利用可能性

15 間葉系細胞由来の悪性腫瘍すなわち肉腫は、化学療法や放射線療法に抵抗性で、外科的切除後も再発を繰り返し、最終的には肺、肝、腹膜などに転移し予後が悪い。わが国における症例数は、消化器外科領域のストローマ腫瘍(GIST)、整形外科領域の骨・軟部肉腫を中心に婦人科領域の平滑筋肉腫、胸部・消化器外科領域の悪性中皮腫、脳外科領域の繊維肉腫、悪性髄膜腫、悪性神経鞘腫等を合わせて年間5000例前後の初発例がある。全がんのおよそ1~2%と少ないものの、若年者にも多発し化学療法に感受性のある一部の症例を除いては有効な治療法がないことから、新治療法の開発を切望する社会的要請が強い。肉腫の病因、病態に関連する遺伝子解析は、骨肉腫や平滑筋肉腫でp53とRb遺伝子、GISTでKIT遺伝子の変異、Ewing肉腫や滑膜肉腫、脂肪肉腫で融合遺伝子の存在が報告されているが、まだ治療に応用できる段

階にはない。また、これまでの動物実験で、p 5 3 やサイトカイン、自殺遺伝子である単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ(H S V - t k)などを種々のベクターを用いて肉腫細胞に直接導入する方法が試みられたが、十分な治療効果が得られていない。

- 5 遺伝子治療は、がん細胞に導入する遺伝子の細胞選択的な作用や発現プロモーターの活性、ウイルスベクターの感染導入など、いろいろなレベルでがん細胞選択性を高めることが可能であり、肉腫に対しても有望な治療法として注目されている。実際、オステオカルシンのプロモーターを用いてH S V - t kを複製能力のないアデノウイルスベクターで骨肉腫選択的に発現させることにより、静脈内投与でも肺転移巣を有意に抑制し得ることが報告された (Cancer Gene Ther. 5, 274-280, 1998)。
- 10 しかし、オステオカルシンは分化段階にある正常な骨芽細胞にも発現しているので、導入遺伝子の発現を制御するだけでは、がん細胞選択性を高めるには不十分である。加えて、分化のマーカー遺伝子のプロモーターによって細胞選択性を高めることは、一方でベクターの汎用性を低下
- 15 させることであり、多種多様な組織、細胞に由来し、それぞれの症例数が限られている肉腫の場合、ベクター開発の費用対効果の面で不利である。

- さらに、これまでの肉腫に対する実験的遺伝子治療に用いられた複製能力を欠如したウイルスベクターやリボソームベクターでは、すべての
- 20 がん細胞に治療遺伝子を導入することは不可能である。したがって、動物実験で延命効果は得られるものの持続的な抗腫瘍効果は期待できない。また、がん細胞への遺伝子導入効率が低ければ、それだけ大量のウイルスベクターが必要であり、過剰な免疫反応やアレルギー反応が起きる危険性も高まる。
- 25

難治性肉腫の治療には、何か従来の方法とは異なる全く新しいアプロ

一チが必要であると考えられてきたが、その手がかりは得られていなかった。本発明の実施例はかかる要望等に応えうるものであり、本発明によると、肉腫に限らず悪性腫瘍等の特定の細胞で複製し腫瘍細胞を破壊しつつ特異的に治療遺伝子を発現する、正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを提供することができる。治療終了後に薬剤でウイルスの複製を停止させることができる安全策を備えたかかる細胞特異的発現複製ベクターを用いることにより、世界で最初のヒトを対象にした細胞選択的な発現複製ベクターを用いた遺伝子治療が可能となる。

カルポニン遺伝子は成体では主として平滑筋細胞に発現しており、特に血管平滑筋細胞の増殖は、腫瘍血管新生やステント留置後の血管狭窄、糖尿病性網膜症などの増殖性血管病変の原因であるため、本発明によって提供されるカルポニンプロモーターをもつ平滑筋細胞特異的発現複製ベクターで、増殖する平滑筋細胞を選択的に破壊することにより、これらの疾患をも治療することが可能である。中でも、本発明によつてはじめて可能となる腫瘍血管平滑筋を選択的に破壊する治療法は、すべての固形癌に有効ながん治療法として、画期的な効果をもたらす可能性がある。さらに、カルポニンを発現するメサングウム細胞の増殖によっておこる増殖性糸球体腎炎や、カルポニンを発現する筋線維芽細胞の増殖によっておこる肺や肝臓などの線維症に対する治療剤としても有効に作用し得るものである。

請 求 の 範 囲

1. 細胞特異的に発現する遺伝子の転写開始制御領域を所定の遺伝子の
上流に組み込んだ成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクタ
5 ーにおいて、前記細胞特異的発現複製ベクターに存在するチミジンキナ
ーゼ（Thymidine kinase）遺伝子を利用して所望の時期にその複製を抑
制しうることを特徴とする成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複
製ベクター。
2. 細胞特異的に発現する遺伝子の転写開始制御領域が、配列番号 1 に
10 示される塩基配列を含む領域であることを特徴とする請求項 1 記載の成
体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター。
3. 配列番号 1 に示される塩基配列を含む領域が、配列番号 2 に示され
る塩基配列からなるヒトカルボニン遺伝子プロモーターを含む領域であ
ることを特徴とする請求項 2 記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異
15 的発現複製ベクター。
4. 配列番号 2 に示される塩基配列を含む領域が、配列番号 3 に示され
る塩基配列を含む領域であることを特徴とする請求項 3 記載の成体正常
細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター。
5. 細胞特異的に発現する遺伝子の転写開始制御領域が、配列番号 1、
20 配列番号 2 又は配列番号 3 に示される塩基配列において、1 若しくは数
個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、かつ転写
開始制御活性を有する塩基配列を含む領域であることを特徴とする請求
項 1 記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター。
6. 転写開始制御領域の上流にエンハンサーが組み込まれていることを
25 特徴とする請求項 1～5 のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細
胞特異的発現複製ベクター。

7. エンハンサーが 4 F 2 エンハンサーであることを特徴とする請求項 6 記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター。
8. 所定の遺伝子のさらに下流に、所定の遺伝子とは異なる目的タンパク質をコードする DNA が連結され、前記転写開始制御領域の制御下に
- 5 目的タンパク質を発現することを特徴とする請求項 1 ～ 7 のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター。
9. 目的タンパク質をコードする DNA が、IRES (internal ribosomal entry site) を介して所定の遺伝子に連結されていることを特徴とする請求項 8 記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製
- 10 ベクター。
10. 目的タンパク質をコードする DNA が、アポトーシス促進関連遺伝子であることを特徴とする請求項 1 ～ 9 のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター。
11. 目的タンパク質をコードする DNA が、血管新生抑制作用をもつ
- 15 タンパク質をコードする DNA であることを特徴とする請求項 1 ～ 9 のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター。
12. 目的タンパク質をコードする DNA が、癌転移抑制作用をもつタンパク質をコードする DNA であることを特徴とする請求項 1 ～ 9 のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター。
- 20 13. 目的タンパク質をコードする DNA が、癌抑制作用をもつタンパク質をコードする DNA であることを特徴とする請求項 1 ～ 9 のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター。
14. 所定の遺伝子が、ウイルス複製関連遺伝子であることを特徴とする請求項 1 ～ 13 のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター。
- 25 15. ウイルス複製関連遺伝子が、ICP 4 又は E1A であることを特

徴とする請求項 1 4 記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター。

1 6 . 発現複製ベクターが、ウイルスベクターであることを特徴とする請求項 1 ～ 1 5 のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的
5 発現複製ベクター。

1 7 . ウイルスベクターが、単純ヘルペスウイルスベクター（H S V ベクター）又はアデノウイルスベクターであることを特徴とする請求項 1 6 記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター。

1 8 . 腫瘍細胞特異的、腫瘍新生血管の増殖平滑筋特異的、増殖性血管
10 病変における増殖平滑筋特異的、糸球体腎炎における増殖メサンギウム細胞特異的、又は線維症における増殖筋線維芽細胞特異的な発現複製ベクターであることを特徴とする請求項 1 ～ 1 7 のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター。

1 9 . リボヌクレオチドリダクターゼ（Ribonucleotide reductase）を
15 コードする D N A を欠失していることを特徴とする請求項 1 ～ 1 8 のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター。

2 0 . 請求項 1 ～ 1 9 のいずれかに記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを、生体細胞組織に導入し、発現複製させることを特徴とする成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターの遺伝子、タンパク質又はペプチドの発現複製方法。
20

2 1 . 請求項 1 ～ 1 9 のいずれかに記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを、生体細胞組織に導入し、発現複製させ、その後の所望の時期に、細胞特異的発現複製ベクターの発現複製を抑制することを特徴とする成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターの遺伝子、タンパク質又はペプチドの発現複製・抑制方法。
25

2 2 . 細胞特異的発現複製ベクターの発現複製の抑制が、アシクロビル

(aciclovir)、ガンシクロビル (ganciclovir) 等の抗ウイルス薬を用いることによる抑制であることを特徴とする請求項 21 記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターの遺伝子、タンパク質又はペプチドの発現複製・抑制方法。

5 23. 請求項 1～19 のいずれかに記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを、生体細胞組織に導入し、発現複製させて前記細胞特異的発現複製ベクターによるチミジンキナーゼ活性を測定することを特徴とする成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターの生体内分布を検出する方法。

10 24. チミジンキナーゼ活性の測定が、 ^{124}I でラベルしたウラシル誘導体 FIAU を用いる Positron Emission Tomography による測定であることを特徴とする請求項 23 記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターの生体内分布を検出する方法。

15 25. 生体細胞組織が、腫瘍組織、血管またはリンパ管狭窄組織、腎炎組織又は線維症組織であることを特徴とする請求項 20～24 のいずれか記載の方法。

26. 請求項 1～19 のいずれかに記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを含むことを特徴とする治療薬。

20 27. 悪性腫瘍、線維症、増殖性血管病変又は増殖性糸球体腎炎に対する治療薬であることを特徴とする請求項 26 記載の治療薬。

28. 悪性線維性組織球種、消化管ストローマ腫瘍又は子宮筋腫に対する治療薬であることを特徴とする請求項 27 記載の治療薬。

25 29. 請求項 1～19 のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを、肺、肝臓などの線維症組織又は乳がん、胃がん、膵臓がんなどの悪性腫瘍組織に導入し、ベクターの複製と遺伝子、蛋白およびペプチドの発現によって、増殖筋線維芽細胞を選択的に破壊

することを特徴とする線維症及び悪性腫瘍の治療方法。

30. 悪性線維性組織球種、消化管ストローマ腫瘍又は子宮筋腫を対象とすることを特徴とする請求項29記載の線維症及び悪性腫瘍の治療方法。

5 31. 請求項1～19のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを、血管またはリンパ管の狭窄組織あるいは動脈硬化組織、糖尿病性網膜症組織に導入し、ベクターの複製と遺伝子、タンパク質又はペプチドの発現によって、増殖平滑筋細胞又は血管周細胞を選択的に破壊することを特徴とする増殖性血管病変の治療方法。

10 32. 請求項1～19のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを、腎炎組織に導入し、ベクターの複製と遺伝子、タンパク質又はペプチドを発現させ、増殖メサンギウム細胞を選択的に破壊することを特徴とする増殖性糸球体腎炎の治療方法。

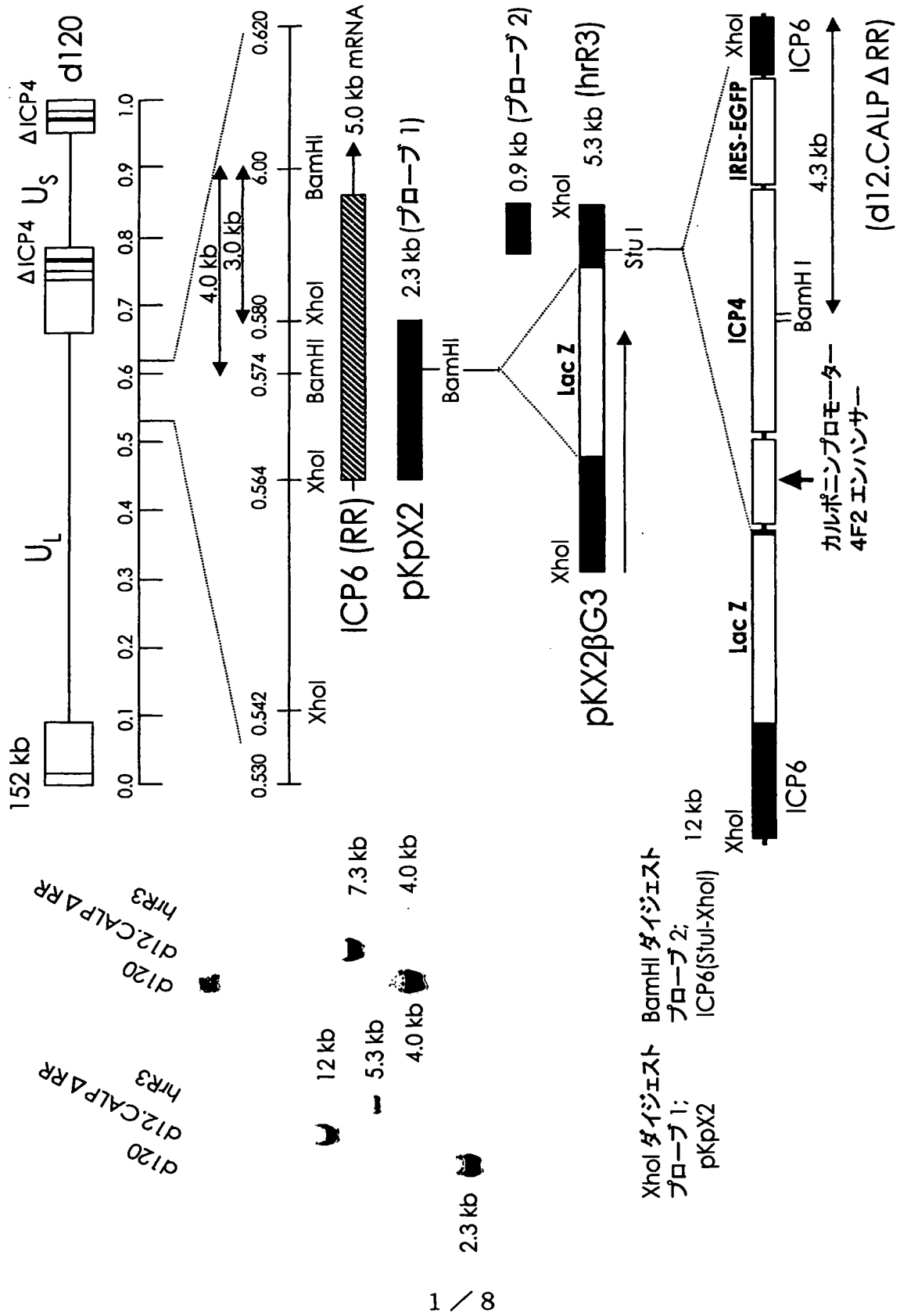
15 33. 細胞特異的発現複製ベクターを、静脈又は動脈に投与することを特徴とする請求項29～32のいずれか記載の治療方法。

34. 所望の時期に、細胞特異的発現複製ベクターの発現複製を抑制することを特徴とする請求項29～33のいずれか記載の治療方法。

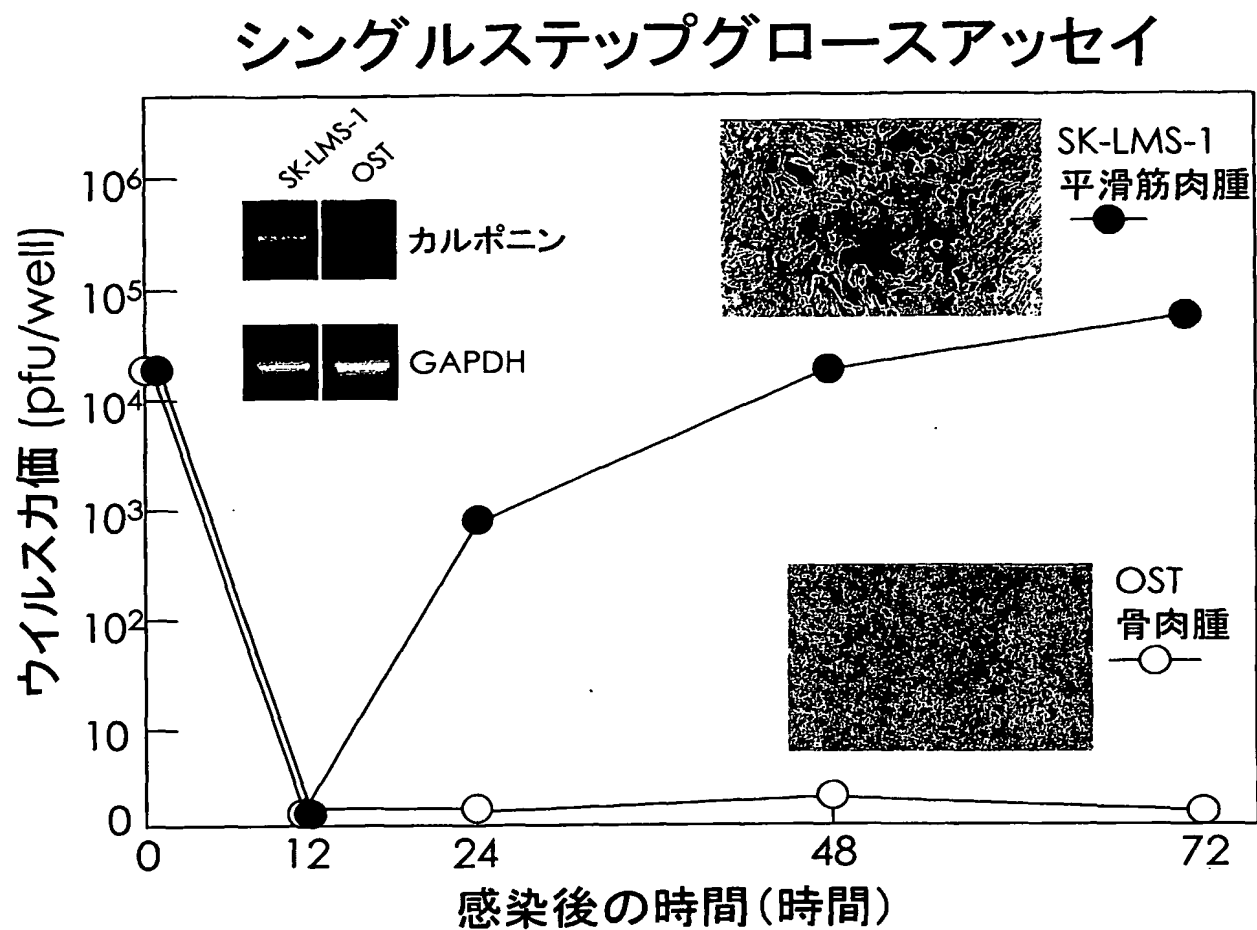
20 35. 細胞特異的に発現する遺伝子の転写開始制御領域が活性化され得る細胞又は該遺伝子を発現する細胞に、請求項1～19のいずれか記載の細胞特異的発現複製ベクターを含む相同組み換え後のウイルス混合液を感染させ、ベクター内に組み込んだ遺伝子の発現を指標にして、アガロースゲルオーバーレイ法を用いず、限界希釈法によって単一クローンにまで精製することを特徴とする細胞特異的発現複製ベクターの製造方法。

25 36. 細胞が、ICP4(－)細胞であることを特徴とする請求項35記載の細胞特異的発現複製ベクターの製造方法。

第 1 図



第 2 図

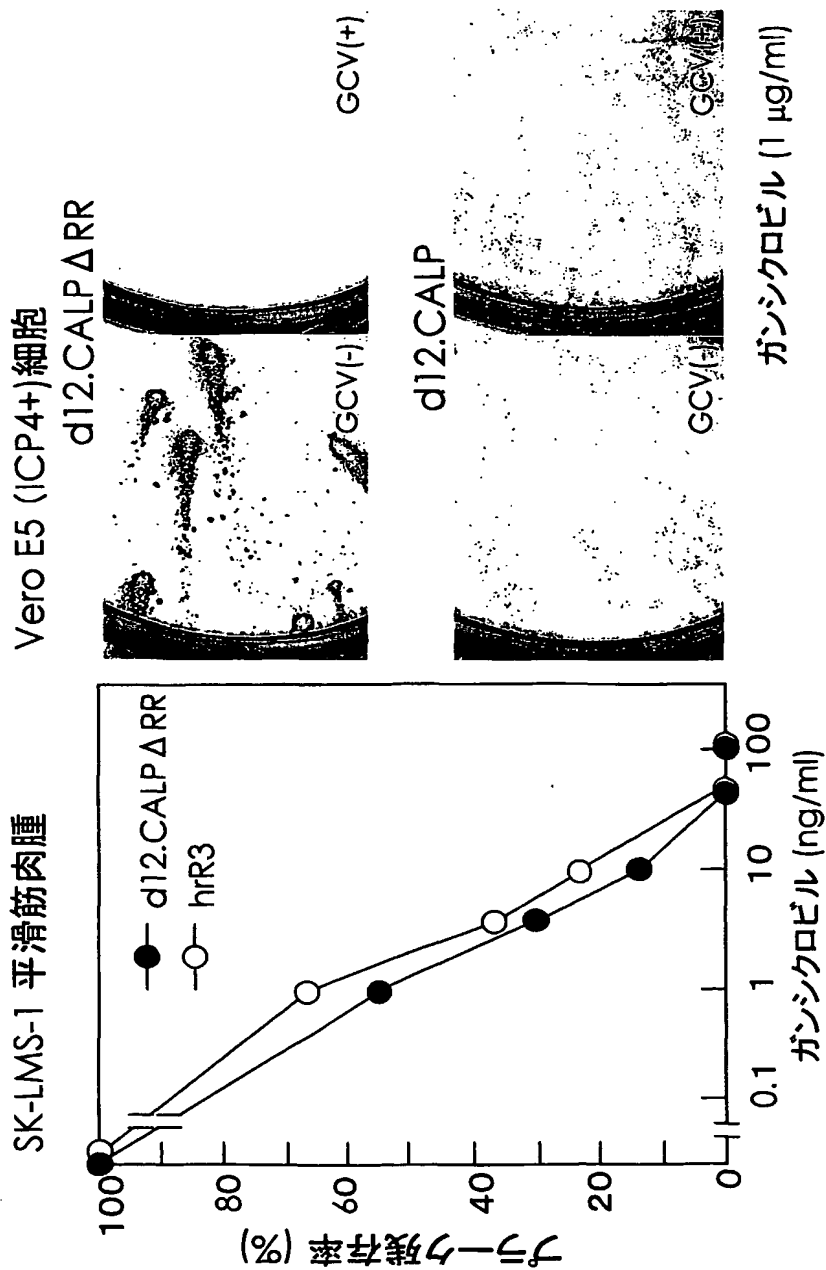


第 3 図

SK-LMS-1 平滑筋肉腫



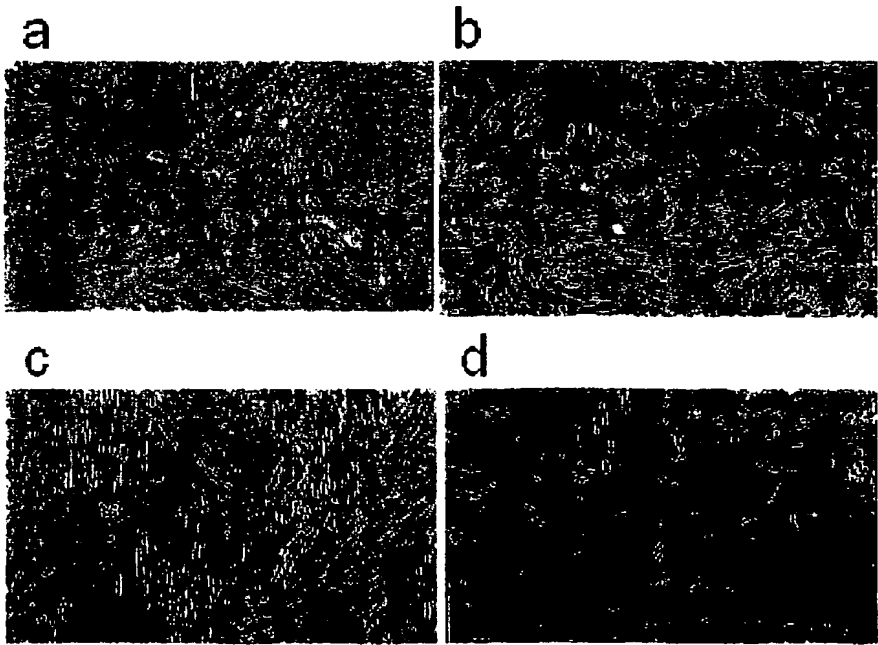
第 4 図



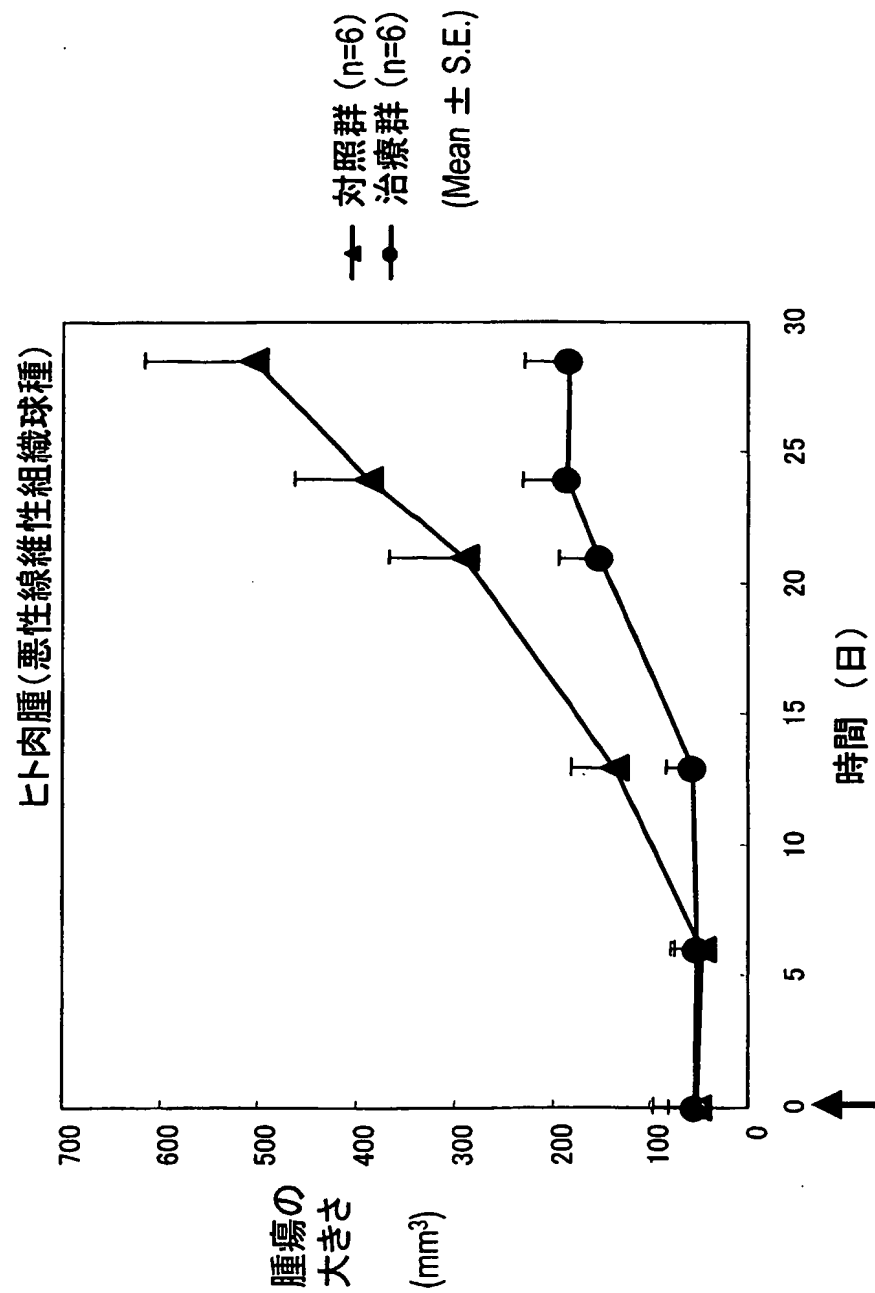
第 5 図



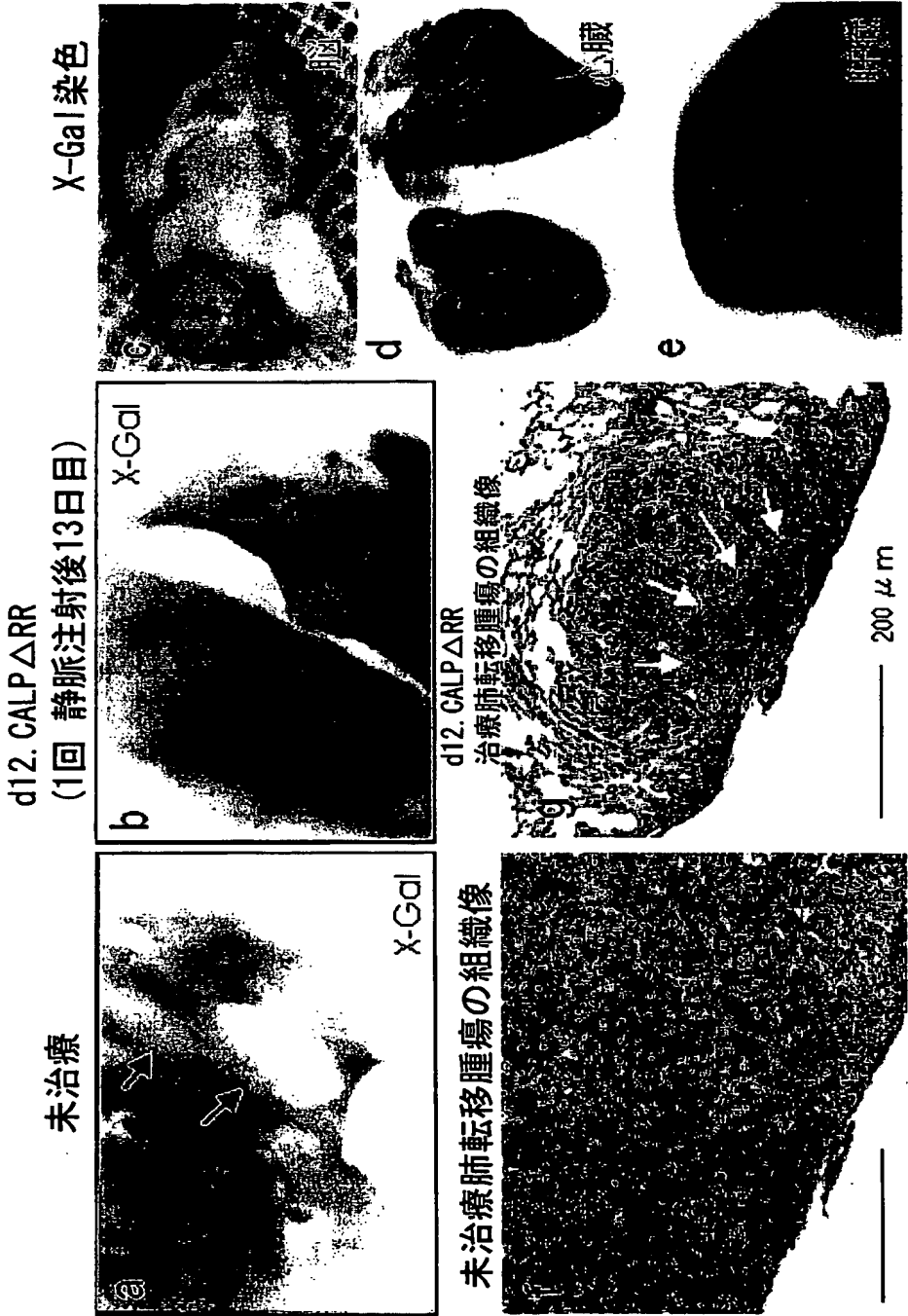
第 6 図



第 7 図



第 8 図



第 9 図

静脈内接種細胞数 5×10^5



未治療

d12. CALP Δ RR
(3回静脈注射)

静脈内接種細胞数 1×10^6



未治療

d12. CALP Δ RR
(3回静脈注射)

SEQUENCE LISTING

<110> JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION

<120> Cell specific express replication vector

<130> B08-01PCT

<140>

<141>

<150> JP P2001-402102

<151> 2001-12-28

<150> JP P2002-255395

<151> 2002-08-30

<160> 9

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 41

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

gaaacaatga cacaatcagc lcccaatacc aagggcctga c

41

<210> 2

<211> 260

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

```

gaaacaatga cacaatcagc tcccaatacc aagggcciga catcacaagg ggaggggaag 60
gcagctgagg ttgtgggggg aggtgccccg ccccttggca ggcccclaca gccaatggaa 120
cggcccclga agagaccggg gtgcctcccg gagcttcaaa aacatgtgag gaggggaagag 180
tgtgcagacg gaacttcagc cgtgcccct gtcttcagcg tcagtgcgcg cactgcccc 240
gccagagccc accggccagc                                     260

```

<210> 3

<211> 333

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Region consist
of human calponin gene promoter and its structural
gene fragment

<400> 3

```

gaaacaatga cacaatcagc tcccaatacc aagggcciga catcacaagg ggaggggaag 60
gcagctgagg ttgtgggggg aggtgccccg ccccttggca ggcccclaca gccaatggaa 120
cggcccclga agagaccggg gtgcctcccg gagcttcaaa aacatgtgag gaggggaagag 180
tgtgcagacg gaacttcagc cgtgcccct gtcttcagcg tcagtgcgcg cactgcccc 240
gccagagccc accggccagc atgtccctg ctacttcaa ccgaggccct gcctacgggc 300
tgtcagccga ggtaagaac aaggtagggg tgg                                     333

```

<210> 4

<211> 445

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

```

gtgagtcag cgcgcccccg tcccggttac ctccggttga atctggiggc ttgcaccgac 60
ccccccccct gtccccagac ggatctagat ggctcttccc tccaaccgt accgacgact 120
gtccccccct cccccacccc ctccccggca catgtcctt cctctcttc ttgaagaaa 180
gccgaccgc cctcactcc gtacagagg tgggtgactc agcgtcttc tccccgcgg 240

```

cgccagaagc cagllgcaac cgglllclga aglaaiglgc aggaciccil acalcagcic 300
 clclgagict cglgallcag ccllgccicc clclclcccc clllgcccc lccccglccc 360
 acccllaggc gclgggagaa gggaggggg ggagglcagg ggccclclcag agggggccica 420
 cllgllaacc cagccccca lllcag 445

<210> 5

<211> 455

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

ggatcccatg tcccalcaga gctaaaagcc ccaggaggag aggggtggctg gtlilgtcccc 60
 acaaaccctt gggatccccg gctccccage cccllgcccc tctctccagc cagactctat 120
 tgaactcccc clclclclcaa acicggggcc agagaacagt gaagtaggag cagccgtaag 180
 tccgggcagg glcclgtcca laaaaggccl tccccgggcc ggcicccccgc cggcagcglg 240
 ccccgccccg gcccgcacca clcclcaaagc atgcagagaa tgtclcgga gccccggtag 300
 actgtclcaa cllggtgclt lcccccaat atggagcclg tglggagica clggggggagc 360
 cggggggggg gagcggagcc ggcllccclt agcagggagg gggccgagga gcgagccagl 420
 gggggaggcl gacalcacca cggcggcagc ccll 455

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: FPI

<400> 6

gaglgcag acggaaclic agcc 24

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:RP1

<400> 7

gtctgtgccc aacttggggt c

21

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:FP2

<400> 8

cccatcacca tcttccagga

20

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:RP2

<400> 9

tgtctatacc aggaaatgag c

21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/13683

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/64, C12P21/00, C12Q1/02, A61K48/00, A61P35/00, 43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/64, C12P21/00, C12Q1/02, A61K48/00, A61P35/00, 43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, BIOSIS/WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Cheon J. et al., Adenovirus-mediated suicide-gene therapy using the herpes simplex virus thymidine kinase gene in cell and animal models of human prostate cancer: changes in tumour cell proliferative activity. BJU Int. 2000 Apr., Vol.85, No.6, pages 759 to 766	1-28,35-36
A	TAKAHASHI K. et al., Transcriptional Targeting of Replication-Competent Herpes Simplex Virus to Proliferating Smooth Muscle Cells. Circulation 2000 Oct., Vol.102, No.18, II-86, 416	1-28,35-36
A	TAKAHASHI K. et al., The 5'-flanking region of the human smooth muscle cell calponin gene contains a cis-acting domain for interaction with a methylated DNA-binding transcription repressor. J.Biochem. (Tokyo), 1996 Jul., Vol.120, No.1, pages 18 to 21	1-28,35-36

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
17 March, 2003 (17.03.03)

Date of mailing of the international search report
08 April, 2003 (08.04.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/13683

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	YAMAMURA H. et al., "Identification of the transcriptional regulatory sequences of human calponin promoter and their use in targeting a conditionally replicating herpes vector to malignant human soft tissue and bone tumors.", Cancer Res. 15 May, 2001 (15.05.01), Vol.61, No.10, p.3969-77	1-28,35-36
A	WO 02/092816 A1 (Japan Science and Technology Corp.), 21 November, 2002 (21.11.02), & JP 2002-335965 A	1-28,35-36
P,A	Kruger M. et al., Involvement of proteasome alpha-subunit PSMA7 in hepatitis C virus internal ribosome entry site-mediated translation. Mol.Cell.Biol. 2001 Dec., Vol.21, No.24, pages 8357 to 8364	1-28,35-36

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/13683

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 29-34

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 29 to 34 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐

No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/64, C12P21/00, C12Q1/02, A61K48/00,
A61P35/00, 43/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/64, C12P21/00, C12Q1/02, A61K48/00,
A61P35/00, 43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DBJ/GeneSeq,
BIOSIS/WPI(DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Cheon J. et al., Adenovirus-mediated suicide-gene therapy using the herpes simplex virus thymidine kinase gene in cell and animal models of human prostate cancer: changes in tumour cell proliferative activity. BJU Int 2000 Apr, Vol. 85, No. 6, p. 759-766	1-28, 35-36
A	Takahashi K. et al., Transcriptional Targeting of Replication-Competent Herpes Simplex Virus to Proliferating Smooth Muscle Cells. Circulation 2000 Oct, Vol. 102, NO. 18, II-86, 416	1-28, 35-36

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

17. 03. 03

国際調査報告の発送日

08.04.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

本間 夏子



4N

9637

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Takahashi K et al., The 5'-flanking region of the human smooth muscle cell calponin gene contains a cis-acting domain for interaction with a methylated DNA-binding transcription repressor. J Biochem (Tokyo) 1996 Jul, Vol. 120, No. 1, p. 18-21	1-28, 35-36
A	Yamamura H. et al., 'Identification of the transcriptional regulatory sequences of human calponin promoter and their use in targeting a conditionally replicating herpes vector to malignant human soft tissue and bone tumors.', Cancer Res. 2001 May 15, Vol. 61, No. 10, p. 3969-77	1-28, 35-36
A	WO 02/092816 A1 (科学技術振興事業団) 2002. 11. 21 & JP 2002-335965 A	1-28, 35-36
PA	Kruger M. et al., Involvement of proteasome alpha-subunit PSMA7 in hepatitis C virus internal ribosome entry site-mediated translation. Mol Cell Biol 2001 Dec, Vol. 21, No. 24, p. 8357-8364	1-28, 35-36

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 29-34 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
請求の範囲 29-34 は、治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT 第17条(2)(a)(i) 及び PCT 規則 39.1(iv) の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4(a) の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.